

**IMMOBILISIERUNG VON MIKROORGANISMEN
DURCH EINSCHLUSS IN POLY-(VINYLALKOHOL)-
UND POLY-(ACRYLSÄURE)-DERIVATE
— ZUR DARSTELLUNG UND ZUR REAKTIVITÄT
HETEROGENER BIOKATALYSATOREN —**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wilfried Beier
aus Genthin

1984



IMMOBILISIERUNG VON MIKROORGANISMEN DURCH EINSCHLUSS
IN POLY-(VINYLALKOHOL)- UND POLY-(ACRYLSÄURE)-DERIVATE

- ZUR DARSTELLUNG UND ZUR REAKTIVITÄT HETEROGENER
BIOKATALYSATOREN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wilfried Beier
aus Genthin

1984

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Manecke

2. Gutachter: Prof. Dr. Kossmehl

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 2. 1984

Tag der Promotion:

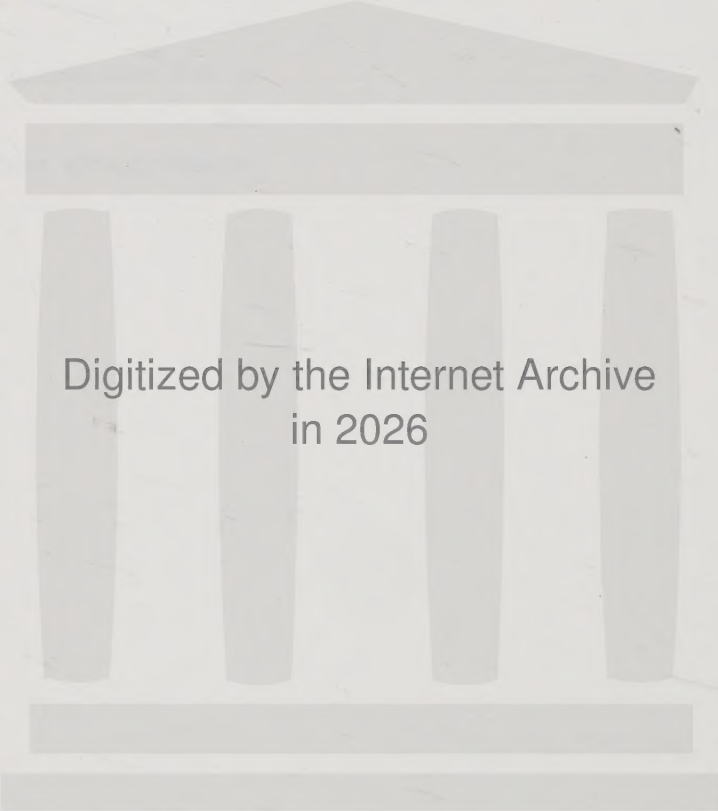
IMMOBILISIERUNG VON MIKROORGANISMEN DURCH EINSCHLUSS
IN POLY-(VINYALKOHOL)- UND POLY-(ACRYLSÄURE)-DERIVATE

- ZUR DARSTELLUNG UND ZUR REAKTIVITÄT HETEROGENER
BIOKATALYSATOREN

MEINER FRAU URSULA

UND

MEINER TOCHTER MAREN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546612_0037

The up-to-date bacteriologist is an enzyme chemist pure and simple and the organic chemist who is not well informed about enzymic reactions is behind the times.

J. B. Summer,

J. Chem. Educ. 29 (1952) 114

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden
bereits veröffentlicht:

1. G. Manecke, W. Beier, Angew. Makromol. Chem. 104 (1982) 39
2. G. Manecke, W. Beier, Angew. Makromol. Chem. 113 (1983) 179

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Manecke am Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. Manecke, danke ich für das Thema dieser Arbeit, für die vielen wertvollen Anregungen und ausführlichen Diskussionen sowie für die mir in jeder Hinsicht großzügig gewährte Unterstützung.

Auch gilt mein Dank für die mir gewährte Möglichkeit, Forschungsergebnisse aus der vorliegenden Dissertation auf internationalen Tagungen einem Fachpublikum vorstellen zu können.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dipl. Chem. U. Klussmann für die anregenden Diskussionen und hilfreichen Hinweise im Verlaufe dieser Arbeit.

Für die Überlassung des in dieser Arbeit verwendeten Corynebakterium simplex- und Bacillus sphaericus-Trockenpulvers sowie für das Hydrocortison und Prednisolon danke ich der Schering AG/Berlin.

Für die Bereitstellung von Candida parapsilosis und Pseudomonas putida danke ich Herrn Prof. Dr. H. J. Rehm vom Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der immobilisierten Corynebakterium simplex-Zellen danke ich Frau A. Brauer und Herrn Dr. H. Labischinsky vom Robert-Koch-Institut in Berlin.



Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	11
2.	Aufgabenstellung	21
3.	Spezieller Teil	23
3.1	Immobilisierung von Mikroorganismen durch Einschluß in polymere Netzwerke	23
3.1.1	Aufbau polymerer Netzwerke zum Einschluß von Mikroorganismen	23
3.1.2	Beschreibung der zur Immobilisierung verwendeten Mikroorganismen	29
3.2	Reaktionsfähige Polymere zur Immobilisierung von Mikroorganismen auf der Basis von Poly- (vinylalkohol)	34
3.2.1	Polyfunktionalisierung von Poly-(vinylalkohol) durch Thiolierung mit ω -Mercaptocarbonsäuren	34
3.3	Photovernetzbare Polymere zur Immobilisierung von Mikroorganismen	37
3.3.1	Polyfunktionalisierung von Poly-(vinylalkohol) mit photosensitiven α , β -ungesättigten Ester- gruppen durch Veresterung mit Acrylsäure	39
3.4	Vernetzung von Poly-(vinylalkohol) mit bifunktionellen und polyfunktionellen Aldehyden durch Acetalbildung	44
3.5	Vernetzung von Poly-(vinylalkohol) durch in situ hergestelltes p-Benzochinon	46
3.6	Veresterung von Poly-(vinylalkohol) mit Zimtsäurechlorid zu hydrophoben Zimtsäurepoly- vinylester und dessen photochemische Vernetzung	47
3.7	Reaktionsfähige Polymere zur Immobilisierung von Mikroorganismen auf der Basis von Poly- (acrylsäurehydrazid) und Acrylsäurehydrazid- N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren	50
3.7.1	Herstellung von Poly-(acrylsäuremethylester) und Acrylsäuremethylester-N-Vinylpyrrolidon- Copolymeren	50
3.7.2	Darstellung der Hydrazide der Poly-(acrylsäure)- Derivate	56

3.7.3	Vernetzung von Poly-(acrylsäurehydrazid) und den Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren durch Hydrazonbildung mit monomeren bifunktionellen und polymeren polyfunktionellen Aldehyden...	59
3.8	Immobilisierung von Mikroorganismen durch Einschluß in die reaktiven Polymerisate	62
3.9	Methoden zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der immobilisierten Mikroorganismen ..	66
3.10	Einfluß der Enzyminduktion auf die Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der C. simplex-Immobilisate	67
3.11	Eigenschaften der C. simplex-Immobilisate, die die Diffusion des Substrates beeinflussen (Zellkonzentration, Partikelgröße)	77
3.11.1	Abhängigkeit der Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der C. simplex-Immobilisate von der Zellkonzentration	79
3.11.2	Abhängigkeit der Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der C. simplex-Immobilisate von der Partikelgröße	88
3.12	Weitere Abhängigkeiten der Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten und freien C. simplex-Zellen	91
3.12.1	Abhängigkeit der Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten C. simplex-Zellen von der Rotationsgeschwindigkeit des Inkubationsschüttlers	93
3.12.2	Abhängigkeit der Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität von der Substrat-Konzentration	96
3.12.3	Abhängigkeit der Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten und freien C. simplex-Zellen von der Menadion-Konzentration	104
3.12.4	Abhängigkeit der Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten und freien C. simplex-Zellen von der Reaktionstemperatur	107
3.12.5	Abhängigkeit der Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten C. simplex-Zellen vom pH-Wert der Substratlösung	110

3.13	Einfluß organischer Lösungsmittel auf die Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten <i>C. simplex</i> -Zellen	112
3.14	Bestimmung der Halbwertszeit der <i>C. simplex</i> -Immobilisate und pseudokristalline Fermentation	119
3.15	Untersuchungen zur Vermehrungsfähigkeit von <i>C. simplex</i> -Zellen in den polymeren Netzwerken	137
3.16	Einfluß von Nährmedien auf die Stabilität der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten <i>C. simplex</i> -Zellen	144
3.17	Lagerstabilität der <i>C. simplex</i> -Immobilisate ...	150
3.18	Weitere Untersuchungen zur Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase der immobilisierten <i>C. simplex</i> -Zellen	152
3.18.1	Einfluß der Bestrahlungsdauer mit UV-Licht auf die Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten <i>C. simplex</i> -Zellen	153
3.18.2	Aktivitätsbestimmung mit den Immobilisaten I-B1/3- <i>C. simplex</i> und I-B1/4- <i>C. simplex</i>	155
3.18.3	Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon mit dem Immobilisat I-B1/1- <i>C. simplex</i> in einem kontinuierlichen Säulenverfahren	156
3.19	Immobilisierung von <i>Bacillus sphaericus</i> durch Einschluß in die reaktiven Polymerisate	158
3.20	Immobilisierung von <i>Pseudomonas putida</i> und <i>Candida parapsilosis</i> durch Einschluß in die reaktionsfähigen Polymerisate	160
4.	Experimenteller Teil	161
5.	Zusammenfassung	180
6.	Literaturverzeichnis	192

1. Einleitung

Mikrobiologische Verfahren dienen schon seit alters her zur Herstellung von Nahrungs- und Genußmitteln, wie zum Beispiel zur Herstellung von Brot, Milchprodukten, Essig und alkoholischen Getränken. Doch erst in den letzten Jahrzehnten ist auch die direkte Gewinnung von Produkten des zellulären Stoffwechsels sowie die Nutzbarmachung der katalytischen Fähigkeiten der Mikroorganismen in das wissenschaftliche und industriell-wirtschaftliche Interesse gelangt.

Zu den mikrobiologischen Prozessen mit wissenschaftlicher und wirtschaftlicher Bedeutung gehören:

- a) Verfahren zur Gewinnung von Produkten des primären zellulären Stoffwechsels, wie zum Beispiel die Gewinnung von Ethanol, Carbonsäuren, Aminosäuren und Aceton
- b) Verfahren zur Gewinnung von Produkten des sekundären Stoffwechsels, wie zum Beispiel die Gewinnung von Antibiotika, Alkaloiden und Vitaminen
- c) Verfahren zur Gewinnung von Bestandteilen der Zellen, wie die Gewinnung von Enzymen, Nucleinsäuren und Polysacchariden
- d) Verfahren zur Gewinnung von Zellen als Biomasse, wie die Gewinnung von Gär- und Backhefen
- e) Verfahren zur Nutzbarmachung der katalytischen Eigenschaften der Mikroorganismen für organisch-chemische Reaktionen.
Die als Biotransformationen bezeichneten Prozesse

können unterteilt werden in

- Oxidationsreaktionen
- Reduktionsreaktionen
- Decarboxylierungen
- Phosphorylierungen
- Aminierungs- und Desaminierungsreaktionen
- Eliminierungs- und Additionsreaktionen
- Acetylierungs- und Desacetylierungsreaktionen,

die selbst wiederum in untergeordnete Reaktionsarten gegliedert sein können (1,2).

Unter Mikroorganismen versteht man eine heterogene Gruppe von einzelligen Organismen, die differenziert werden in Prokaryonten (Mikroorganismen ohne echten Zellkern) und Eukaryonten (Mikroorganismen mit echtem Zellkern). Zu den Eukaryonten zählen die Algen (mit Ausnahme der blaugrünen Algen), die Protozoen, Pilze und Schleimpilze. Zu den Prokaryonten werden die Bakterien und die blaugrünen Algen gerechnet.

Es besteht im allgemeinen eine feste Beziehung zwischen dem Mikroorganismus und seinen Stoffwechselprodukten bzw. der Stoffwechselreaktion. Da Enzyme die Träger der katalytischen Aktivitäten der Mikroorganismen sind, lassen sich viele Biotransformationsreaktionen auch mit aus Zellen isolierten Enzymen durchführen. Enzymatisch katalysierte Reaktionen werden bereits in vielen Bereichen als Ergänzung und Erweiterung der chemischen Synthesemöglichkeiten angesehen. Oft sind die enzymkatalysierten Verfahren den rein chemischen Methoden überlegen.

Die Selektivität der biokatalytisch wirkenden Enzyme erlaubt die gezielte Veränderung selbst chemisch inerter Moleküle. Temperatur-, säure- und basenempfindliche Substanzen lassen sich mit Hilfe von Enzymen bzw. mit entsprechend ausgewählten Mikroorganismen in kurzer Zeit schonend zu den gewünschten Produkten umwandeln.

Zu den Vorteilen enzymkatalysierter Reaktionen gegenüber chemischen Reaktionen gehören:

- a) die Substrat- und Ortsspezifität
- b) der regio- und stereospezifische Ablauf der katalysierten Reaktion
- c) die milden und schonenden Reaktionsbedingungen (Umsetzungen bei Raumtemperatur und Normaldruck)
- d) die hohe Reaktionsgeschwindigkeit
- e) die Einschränkung von Nebenreaktionen
- f) die verringerte Umweltbelastung durch Vermeiden von aggressiven Reagenzien und organischen Lösungsmitteln.

Als nachteilig erweist sich bei den enzymkatalysierten Reaktionen:

- a) die oft geringe Stabilität der Enzymsysteme
- b) die Einschränkung der enzymkatalysierten Reaktion auf wäßrige Lösungen
- c) die hohen Kosten bei der Isolierung und Reinigung der Enzyme.

Die hohen Kosten der Enzymgewinnung lassen sich reduzieren, wenn die Enzyme mehrmals in aufeinanderfolgenden Reaktionsprozessen eingesetzt werden können. Im allgemeinen ist jedoch eine Abtrennung der freien Enzyme aus dem Reaktionsmedium schwierig und führt oft zu deren Desaktivierung. Es wurden daher zahlreiche Methoden zur Immobilisierung von Enzymen an Feststoffpartikeln entwickelt (3,4).

Durch eine Heterogenisierung von chemischen und biologischen Katalysatoren lassen sich oft beträchtliche Vorteile erzielen (5). Durch die Immobilisierung wird nicht nur eine leichtere Abtrennung des Biokatalysators aus seiner Reaktionslösung ermöglicht, vielmehr zeigt das immobilisierte Enzym oft auch eine höhere katalytische und thermische Stabilität. Darüberhinaus erlaubt die immobilisierte Form des Biokatalysators eine wahlweise Reaktionsführung in kontinuierlichen Säulen-Prozessen oder in diskontinuierlichen Batch-Prozessen.

Immobilisierte zellfreie Enzyme haben bereits in einigen Fällen eine industriell- wirtschaftliche Anwendung gefunden (6-8). Jedoch verhinderte bisher eine ungünstige Wirtschaftlichkeitsberechnung einen größeren industriellen Einsatz der Enzymimmobilisate.

Die Wirtschaftlichkeit enzymatisch katalysierter Verfahren kann mit der folgenden Formel 1 abgeschätzt werden (9):

$$(1) \quad y = k \cdot a / (b \cdot x)$$

$$b = v \cdot t / K_m$$

y: Kosten der enzymkatalysierten Reaktion für die pro Katalysatormenge und Zeiteinheit hergestellte Produktmenge

k: Umrechnungsfaktor

a: Herstellungskosten des Katalysators

b: Ausdruck für den Wirkungsgrad des Biokatalysators

x: Standzeit (Anzahl der Reaktionsansätze mal der Einsatzzeit)

v: Substratumsatz pro Zeiteinheit und Reaktorvolumen

t: Verweilzeit

K_m : scheinbare Affinitätskonstante

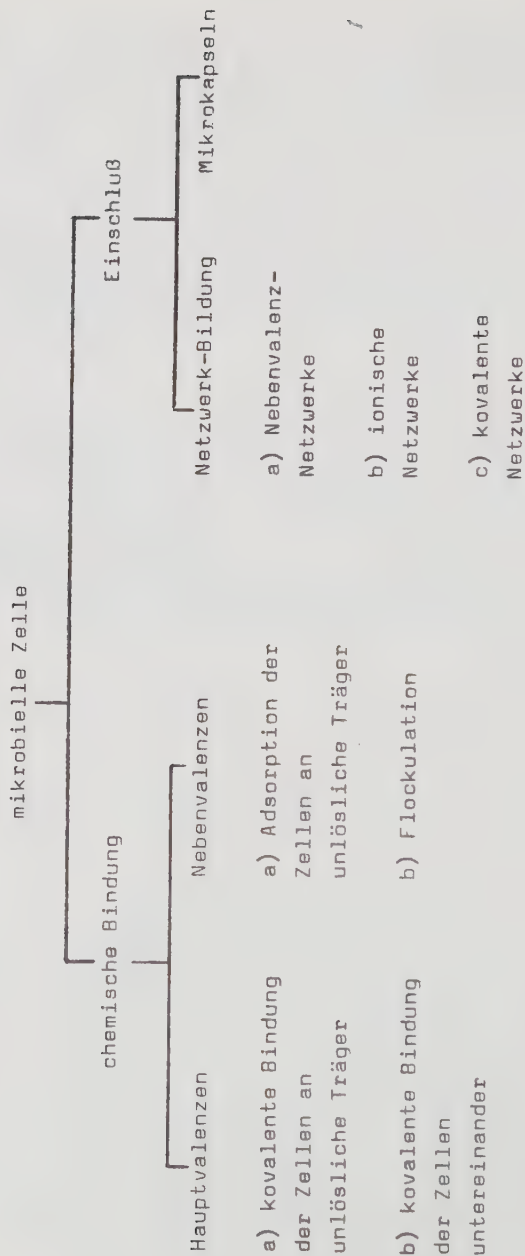
Die beim Einsatz von Biokatalysatoren anfallenden Kosten lassen sich erheblich reduzieren, wenn anstelle der isolierten, zellfreien Enzyme die ganze mikrobielle Zelle selbst zur Reaktionsführung eingesetzt werden kann. Biotransformationen mit frei suspendierten Mikroorganismen lassen sich nur in diskontinuierlichen Verfahren durchführen. Eine kontinuierliche Abtrennung der mikrobiellen Zellen aus dem Reaktionsmedium ist technisch nur in wenigen Ausnahmen möglich. Die Fixierung von ganzen mikrobiellen Zellen an unlösliche Träger eröffnet daher weitgehende Vorteile in der mikrobiologischen Prozeßführung. Neben der einfachen Handhabung der immobilisierten Zellen und der leichten Abtrennung der heterogenisierten Biokatalysatoren aus ihren Reaktionslösungen ist durch die Immobilisierung der Zellen oft eine Steigerung der Langzeit-Stabilität der enzymatischen Aktivität zu erreichen. Die immobilisierten Mikroorganismen können dann wiederholt in neuen Reaktionsprozessen eingesetzt werden.

Zu den in der Literatur beschriebenen Methoden zur Immobilisierung von ganzen mikrobiellen Zellen gehören (10):

- a) die physikalische Adsorption auf Oberflächen anorganischer und organischer Träger
- b) der Einschluß in Mikrokapeln
- c) die kovalente Bindung an polymere Träger
- d) der Einschluß in die Poren vernetzter Gele
- d) die Vernetzung der Zellen untereinander.

Eine skizzenhafte Übersicht über die Verfahren zur Immobilisierung von mikrobiellen Zellen gibt Abb. 1.

Abb. 1: Übersicht über die Verfahren zur Immobilisierung ganzer mikrobieller Zellen



Die Entwicklung von Verfahren zur Immobilisierung mikrobieller Zellen begann 1960 mit den Arbeiten von Hattori und Furusaka (11). 1966 beschrieben Mosbach und Mosbach erstmals eine Methode zur Einschlußfixierung von Zellen (12). Die geometrische Größe und die Form der Zellen favorisieren seither in eindeutiger Weise die Immobilisierung der Zellen nach der Einschlußmethode.

Nach der Art der Vernetzungsreaktion des Polymeren lassen sich die Einschlußmethoden unterteilen in (10):

<u>Netzwerk-Bildung</u>	<u>Art der Vernetzung</u>	<u>Beispiele</u>
Niederschlags- Bildung (z.B. durch Temperatur- oder pH-Wert-Änderung)	unspezifisch (Über Nebenvalenz- Bindungen)	Collagen Carragenan
ionische Bindung bei Polyelektrolyten	ionisch	Ca-Alginat
Polykondensation Polyaddition	kovalent- heteropolar	Polyurethan Epoxydharze
Polymerisation	kovalent- homeopolar	Polyacrylamid

Das weitaus am häufigsten angewendete Verfahren zur Immobilisierung von Mikroorganismen ist bisher die Einschließung der Zellen in Polyacrylamid-Gele.

Eine Anwendung finden immobilisierte Mikroorganismen bereits auf technischen und analytischen Gebieten, in der Industrie, der Medizin und in der Zellbiologie.

Im Vergleich mit der Immobilisierung von Enzymen bietet die Immobilisierung von ganzen mikrobiellen Zellen die im folgenden aufgeführten Vorteile:

- a) die Herstellung des Biokatalysators ist kostengünstiger, da die Isolierung und Reinigung des Enzyms entfällt
- b) die verschiedenen Enzymsysteme der Zelle ermöglichen die Umwandlung eines Substrates durch mehrfache aufeinanderfolgende Katalyse in bestimmter Reihenfolge (Multi-step-Reaktionen)
- c) der zur enzymatischen Katalyse notwendige Cofaktor ist teilweise bereits in der Zelle vorhanden und kann hier auch regeneriert werden
- d) es besteht die Möglichkeit der Reaktivierung der Zellen durch Zugabe eines geeigneten Nährmediums.

Es ist grundsätzlich möglich, neben Bakterien- auch Pflanzen- und Tierzellen zu immobilisieren (13). Die Zellen können sich hier im Wachstum oder in einem ruhenden, vom Wachstum entkoppelten Zustand befinden. Möglich ist es auch, Organellen mit ihren biokatalytischen Eigenschaften zu immobilisieren (14).

Durch die vielfältigen biokatalytischen Fähigkeiten der Zellen und Zellbestandteile eröffnet sich daher ein weites Anwendungsgebiet mit zahlreichen Möglichkeiten der enzymatischen Katalyse.

Zu den Nachteilen der immobilisierten Mikroorganismen gegenüber den polymerfixierten Enzymen müssen gerechnet werden:

- a) die geringe Enzymkonzentration im Mikroorganismus führt zu geringeren Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Biotransformation

- b) die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die eingeschränkte Diffusion des Substrates durch die Zellwand und die Zellmembranen limitiert
- c) durch die Vielzahl verschiedener Enzymsysteme in der Zelle lassen sich unerwünschte Folge- und Nebenreaktionen nicht immer verhindern
- d) die lebende Zelle ist empfindlich gegen hohe Substratkonzentrationen.

Nur bedingt lassen sich einige der genannten Nachteile durch geeignete Maßnahmen ausschließen. Beispielsweise läßt sich die Permeabilität der Zellwand durch Detergentien, Antibiotika oder organische Lösungsmittel erhöhen.

Durch Inhibierung der für die Nebenreaktionen verantwortlichen Enzyme durch Hitzebehandlung, durch extreme pH-Werte oder durch Detergentien lassen sich teilweise unerwünschte Nebenreaktionen eliminieren (15).

Eine Schädigung des zellulären Stoffwechselzyklus durch hohe Substratkonzentrationen wird durch die Immobilisierung von abgestorbenen, aber noch enzymatisch aktiven Mikroorganismen vermieden.

Durch "genetic engineering" gezüchtete mikrobielle Hochleistungsstämme können die Reaktionsgeschwindigkeiten bei den Biotransformationsreaktionen verbessern. Weiterhin erlauben die hochgezüchteten Mikroorganismen die Synthese neuer Reaktionsprodukte (16).

Eine Desaktivierung der immobilisierten Mikroorganismen während der Reaktionsführung kann auf chemischen oder physikalischen Gründen beruhen. Zu den zu einem Verlust an enzymatischer Aktivität führenden Ursachen zählen:

- a) der Abbau von Enzymen durch zelleigene Proteasen
- b) die Infektion durch andere Mikroorganismen oder Bakteriophagen

- c) die Inaktivierung der Zelle durch Stoffwechselgifte
- d) die Inaktivierung der zellulären Enzyme durch thermische oder pH-Wert-Belastung
- e) die Lyse von Zellen und damit verbunden das Freisetzen von Zellbestandteilen (Digestion)
- f) das Verstopfen der Poren des Katalysators durch wachsende Zellen oder durch Kristallisation von Substrat und Produkt auf der Katalysatoroberfläche
- g) die mechanische Zerstörung oder chemische Zersetzung des Katalysatorträgers unter den Bedingungen der Reaktionsführung.

Eine ausführliche Darstellung der Immobilisierung ganzer mikrobieller Zellen ist in zahlreichen Übersichtsartikeln und Monographien behandelt worden (17-23).

2. Aufgabenstellung

Es war Aufgabe der vorliegenden Arbeit, neue Verfahren zur Immobilisierung von ganzen mikrobiellen Zellen zu entwickeln. Die Immobilisierung der Mikroorganismen sollte nach der Einschlußmethode in kovalent-vernetzte polymere Netzwerke durchgeführt werden.

Die Polymerfixierung von Zellen nach dem Einschlußverfahren wurde bisher hauptsächlich an Poly-(acrylamid) und an Biopolymeren untersucht. Für die vorliegende Dissertation wurden als vollsynthetische Hochpolymere Poly-(vinylalkohol) (PVA) und Poly-(acrylsäurehydrazid) ausgewählt.

Die Eignung von Poly-(vinylalkohol) als Trägermaterial zur Immobilisierung von zellfreien Enzymen erwies sich bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit (24).

Die Derivatisierung von PVA durch verschiedene funktionelle Gruppen sollte zu einem wasserlöslichen polyfunktionalisierten Produkt führen, mit dem in Gegenwart der Mikroorganismen ein unlösliches Immobilisat mit biokatalytischer Aktivität hergestellt werden konnte.

Die Eignung von Poly-(acrylsäure)-Derivaten zur Immobilisierung ganzer mikrobieller Zellen sollte ebenfalls überprüft werden.

Der Einfluß der polymeren Matrix sowie der Immobilisierungsbedingungen auf die biokatalytischen Eigenschaften der immobilisierten Zellen sollten untersucht und durch Variation der die biokatalytische Aktivität beeinflussenden Faktoren sollten Optimierungsmöglichkeiten aufgezeigt werden.

Besonderer Wert wurde hierbei auf die Wiederverwendbarkeit der Immobilisate bei aufeinanderfolgenden Reaktionsansätzen gelegt. Die biokatalytischen Aktivitäten der immobilisierten Zellen sollten bestimmt und mit denen der freien Zellen verglichen werden.

Teile der in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Ergebnisse sind in mehreren Publikationen veröffentlicht (25-27). Ein Teil der beschriebenen Immobilisierungsverfahren wurde durch die Schering AG/Berlin in mehreren Patentschriften patentrechtlich geschützt.

3. Spezieller Teil

3.1 Immobilisierung von Mikroorganismen durch Einschluß in polymere Netzwerke

3.1.1 Aufbau polymerer Netzwerke zum Einschluß von Mikroorganismen

Die Zielsetzung der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zur Immobilisierung von ganzen mikrobiellen Zellen war die Synthese von Biokatalysatoren, die erfolgreich zu Biotransformationsreaktionen eingesetzt werden können. Der Begriff "Biokatalysator" umfaßt hier die Mikroorganismen ebenso wie das zur Immobilisierungsreaktion verwendete Polymere.

Das zu einem Teil des Biokatalysators gewordene Polymere muß daher bestimmte Eigenschaften aufweisen, wie

- a) eine ausreichende mechanische Stabilität verbunden mit hoher Druck- und Abriebfestigkeit
- b) eine ausreichende Stabilität gegen chemische Substanzen und organische Lösungsmittel, gegen Temperatur- und pH-Wert-Belastungen
- c) eine ausreichende Stabilität gegen unerwünschten mikrobiellen Befall
- d) eine hohe Permeabilität für Substrat, Cofaktor und Produkt sowie für den bei aeroben Reaktionen notwendigen Sauerstoff.

Von dem bei der Synthese des Biokatalysators angewendeten Immobilisierungsverfahren wurde erwartet, daß es

- a) für möglichst viele Mikroorganismen angewendet werden könnte
- b) die enzymatische Aktivität der immobilisierten Zellen möglichst nicht vermindert werden würde und
- c) eine hohe Zellbeladung des Polymeren möglich wäre.

Ein geeigneter Biokatalysator ist demnach nur durch ein schonendes Immobilisierungsverfahren unter Verwendung von Polymeren, die die oben erwähnten Eigenschaften besitzen, herstellbar.

Doch selbst der ideale und optimierte Biokatalysator stellt einen Kompromiß zwischen allen aufgeführten Eigenschaften dar. Einige der Eigenschaften sind voneinander abhängig und zeigen oft gegenläufige Einflüsse. Zum Beispiel wird sich mit zunehmendem Gehalt des Immobilisates an polymeren Bestandteilen zwar die mechanische Stabilität erhöhen, jedoch vermindert sich in der Regel die Permeabilität für Substrat und Produkt.

Wie aus der Zahl der bisher erschienenen Literatur zu erkennen ist, hat -wie bereits erwähnt- die Einschlußmethode als Verfahren zur Immobilisierung von Mikroorganismen das größte Interesse erlangt.

Bei dem Einschlußverfahren erfolgt die Netzbildung des Polymeren in Gegenwart der Mikroorganismen. Die zur Polymerisation und zur Vernetzung führenden Reaktionsbedingungen sowie die Polymerisations-Initiatoren und Vernetzungskomponenten beeinflussen in drastischer Weise die enzymatische Aktivität der immobilisierten Zellen. Eine sorgfältige Auswahl der Monomeren bzw. der Polymeren, der Polymerisations- und Vernetzermittel, der Lösungsmittel sowie die strenge Einhaltung von schonenden Reaktionsbedingungen ist daher bei den Einschlußfixierungen unbedingt

notwendig. Um eine irreversible Schädigung der Zellen während der Immobilisierung zu vermeiden, muß jeder der einzelnen Reaktionsschritte unter zellphysiologisch vertretbaren Reaktionsbedingungen durchgeführt werden.

Funke (28) hat polymere organische Netzwerke nach ihrem Bindungstyp, ihren Syntheseprinzipien und ihrem Reaktionstyp beschrieben (Abb. 2).

Abb. 2: Einteilung vernetzter Makromoleküle nach dem Reaktionstyp

<u>Bindungstyp</u>	<u>Polyreaktionstyp</u>
kovalent	Polymerisation von Monomeren mit a) ungesättigten Bindungen (radikalisch, ionisch, ionisch und radikalisch) b) Ringstruktur Polykombination Polydimerisation Polyaddition Polykondensation
ionisch	Ionomerisation
komplex	Polykoordination
H-Brücken	
nebervalent (Dispersion, Dipol-Dipol, Dipol-ind. Dipol, Dipol-Ion)	[Kristallisation, - Aggregation, Assoziation
mechanisch	Kettenverschlingung

Bei der Auswahl der Netzwerk-Typen ist vor allem zu berücksichtigen, daß die Bildung des polymeren Netzwerkes in Gegenwart der Mikroorganismen erfolgt. Ein praktischer Einsatz der Immobilisate ist auch nur dann möglich, wenn die Formgebung und die mechanischen Eigenschaften des Polymeren kontrolliert hergestellt werden können.

Die Synthese eines polymeren Netzwerkes kann durch eine ein- oder mehrstufige Reaktion erfolgen.

Zur Einstufensynthese zählt die vernetzende Polyreaktion. Hier werden Monomere in Gegenwart eines Vernetzers und eines Initiators vernetzend polymerisiert.

Bei der Zweistufensynthese erfolgt in einer Vorreaktion eine Polymerisation zu einem linearen Präpolymeren.

Die Vernetzung des Präpolymeren folgt in einem gesonderten Reaktionsschritt (29).

Bei einer vernetzenden Polyreaktion in einer Einstufenreaktion kann es unter dem Einfluß niedermolekularer monomerer Verbindungen bei den zu immobilisierenden Mikroorganismen zu einem teilweisen oder auch vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität kommen. In der Regel werden die Inaktivierungen zu irreversiblen Schädigungen der Zellen führen.

Durch die Reaktion von niedermolekularen Monomeren mit der Zelle kann es im Einzelfall bei den immobilisierten Mikroorganismen auch zur Bildung neuer, vorher nicht bekannter Reaktionsprodukte kommen (30).

Auch bei einer Zweistufenreaktion kann die nachfolgende Vernetzungsreaktion zu einem Aktivitätsverlust bei den immobilisierten Zellen führen. Doch erlaubt hier die Aufgliederung des Produktionsprozesses zur Herstellung von Immobilisaten in mehrere aufeinanderfolgende Teilschritte, wie es die Verwendung von Präpolymeren mit nachfolgender Polyfunktionalisierung und die getrennte Vernetzungsreaktion darstellen, die Optimierung jedes

einzelnen Verfahrensschrittes. Daraus ergeben sich vielfältige Vorteile gegenüber der direkten Copolymerisation von monomeren Verbindungen und der Immobilisierungsreaktion in einem einzigen Verfahrensschritt, wie es die Einstufensynthese beschreibt.

Um bei der Immobilisierungsreaktion einen Verlust an enzymatischer Aktivität zu vermeiden, erweist es sich oft als notwendig, niedermolekulare Verbindungen nur kurzfristig und in niedrigen Konzentrationen auf die mikrobiellen Zellen einwirken zu lassen. Höhermolekulare Verbindungen zeigen auf Mikroorganismen eine geringere toxische Wirkung. Der Transport durch die Zellwand und die Zellmembranen erfolgt bei chemischen Substanzen mit einem Molekulargewicht über 700 D nur langsam oder gar nicht (31). Die Permeabilität der äußeren Bakterienmembranen für niedermolekulare Verbindungen ist in der Literatur beschrieben (32).

In der vorliegenden Arbeit wurden aus den genannten Gründen neue Immobilisierungsmethoden nach dem zweistufigen Netzwerk-Syntheseprinzip entwickelt.

Die Immobilisierung der Mikroorganismen erfolgte durch Einschlußfixierung in polymere Gele auf der Basis von Poly-(vinylalkohol) und Poly-(acrylsäure).

Polymere Gele sind in ein flüssiges Medium eingebettete elastische, formstabile Massen, die aus dreidimensionalen polymeren Netzwerken bestehen. Die Wechselwirkung zwischen dem Polymergerüst und der flüssigen Phase verleiht dem Gel seine charakteristischen Eigenschaften.

Die Eigenschaften von an PVA-Derivaten durch kovalente Bindung immobilisierten zellfreien Enzymen wurden von Vogt (33) beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere reaktive Derivate des Poly-(vinylalkohols) und der Poly-(acrylsäure) hergestellt, die sich nach dem Prinzip der beschriebenen Zweistufensynthese in einer gesonderten Reaktion nachträglich vernetzen ließen.

Die chemischen Umsetzungen an den Ausgangspolymeren Poly-(vinylalkohol) und Poly-(acrylsäure) durch polymer-analoge Reaktionen führten zu Polymerisaten mit neuen chemischen und physikalischen Eigenschaften.

Die Umsetzung funktioneller Gruppen von Makromolekülen weist gegenüber gleichen oder ähnlichen Reaktionen in der niedermolekularen Chemie Besonderheiten auf, die sich durch die Kettenstruktur der Polymermoleküle erklären lassen (34). Die polymeranalogen Reaktionen werden durch die Taktizität des Polymeren, durch sterische Faktoren, durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken-Bindungen und bei Polymeren mit elektrisch geladenen Gruppen auch durch elektrostatische Wechselwirkungen stark beeinflusst. Sterische Faktoren zeigen bei chemischen Reaktionen an Makromolekülen einen stärkeren und vielfältigeren Einfluß als bei niedermolekularen Verbindungen. Durch bereits eingeführte funktionelle Gruppen werden die benachbarten reaktiven Gruppen für das neue Reagenz immer schwerer zugänglich. Der Einfluß benachbarter Gruppen eines Moleküls ist zwar nicht nur auf Makromoleküle beschränkt, er tritt hier jedoch besonders intensiv in Erscheinung. Die Lösung eines makromolekularen Stoffes besteht aus einzelnen Makromolekülknäueln, die durch Bereiche reinen Lösungsmittels voneinander getrennt sind. Ebenfalls beeinflusst werden die polymeranalogen Reaktionen durch die verminderte Beweglichkeit der Ketten-segmente der Makromoleküle in höher konzentrierten Lösungen (35). Die durch polymeranaloge Reaktionen erhaltenen Umwandlungsprodukte sind deswegen chemisch nicht einheitliche Derivate. Nebenreaktionen wie teilweiser Abbau des Polymergerüsts, Bildung von Verzweigungsstellen, Vernetzungen usw. lassen sich oft nicht vermeiden. Jedoch verläuft die Umwandlung reaktionsfähiger Gruppen im Polymeren unter weitgehendem Erhalt des makromolekularen Ausgangsgerüsts.

3.1.2 Beschreibung der zur Immobilisierung verwendeten Mikroorganismen

Die Immobilisierung durch Einschlußfixierung in die Polymerisate erfolgte mit Bakterien und Hefen der Species

Corynebakterium simplex (synonym: *Arthrobacter simplex*)
ATCC 6949

Bacillus sphaericus (synonym: *Bacillus lentus*)
ATCC 7054, 7055, 12 488, 13 805

Pseudomonas putida
ATCC 21 244

Candida parapsilosis

Corynebakterium simplex und *Bacillus sphaericus* wurden von der Schering AG/Berlin angezüchtet und mir für Immobilisierungsversuche freundlicherweise zur Verfügung gestellt. *Pseudomonas putida* und *Candida parapsilosis* wurden mir dankenswerterweise von Prof. Dr. H. J. Rehm vom Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster überlassen.

Die *Candida*-Zellen gehören als Hefen zu den eukaryoten Protisten. Die oval knospenden Hefe-Zellen haben eine Größe von 2-3 mal 4-6 μm .

Die *Corynebakterium simplex*-, die *Bacillus sphaericus*- und die *Pseudomonas*-Zellen gehören als Bakterien zu den prokaryoten Protisten.

Die Eignung der in dieser Arbeit beschriebenen Polymerisate zur Immobilisierung von ganzen mikrobiellen Zellen wurde hauptsächlich mit *Corynebakterium simplex* untersucht.

Corynebakterien sind grampositive, unbewegliche Stäbchen, die an ihren Enden keulenförmig aufgetrieben sind. Sie gehören zu den nicht sporenbildenden Bakterien. Die Zellen sind etwa 0,5-1 μm breit und einige μm lang. Einige Species der Corynebakterien gehören zur normalen Flora des menschlichen Respirationstraktes (z.B. *C. pseudodiphtheriae* und *C. xerosis*), der Schleimhäute und der Haut (*C. acnes*). Auch existieren pathogene Formen wie *C. diphtheriae* (Diphtherie) und *C. minutissimum* (Erkrankungen der Haut).

Mit Hilfe immobilisierter Mikroorganismen werden bereits zahlreiche organische Verbindungen hergestellt oder umgewandelt. Ein besonderes Interesse hat der Einsatz immobilisierter Zellen bei der mikrobiologischen Umwandlung von Steroids-substanzen gefunden. Besonders auf diesem Gebiet sind die mikrobiologischen Verfahren den rein chemischen Methoden überlegen, da die chemischen Dehydrogenierungsreaktionen über zahlreiche Synthesestufen verlaufen und dies in der Regel die Ausbeute vermindert.

Über die Möglichkeiten der Δ^1 -Dehydrogenierung von Steroidmolekülen mittels rein chemischer Methoden gibt Fieser und Fieser (36) einen zusammenfassenden Überblick.

Kulturen der Species *Corynebacterium simplex* und *Bacillus sphaericus* katalysieren die Δ^1 -Dehydrierung von 3-Keto- Δ^4 -steroiden (37,38). Weitere Mikroorganismen mit Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität sind beispielsweise *Pseudomonas testosteroni*, *Nocardia restrictus* und *Bacillus cyclo-oxydans* (39).

Kulturen von *Flavobacterium dehydrogenans* (ATCC 13 930) finden unter anderem Anwendung zur Umwandlung von 3 β -Hydroxy- Δ^4 -steroiden in 3-Keto- Δ^4 -steroiden. Mit *Saccharomyces uvarum* (NCYC 91 oder CBS 1508) können Ketosteroiden reduziert werden. Ein Seitenkettenabbau von Steroiden kann unter anderem mit *Mycobacterium spec.* (NRRL-B 3683 und NRRL-B 3805) durchgeführt werden.

Zur 11 α - und 11 β -Hydroxylierung von Steroiden können Kulturen von *Aspergillus ochraceus* (CBS 13 252, ATCC 12 337, ATCC 18 500 oder NRRL 405) oder *Curvularia lunata* (NRRL 2380, NRRL 2434, ATCC 12 017 oder IFO 6286) herangezogen werden (2).

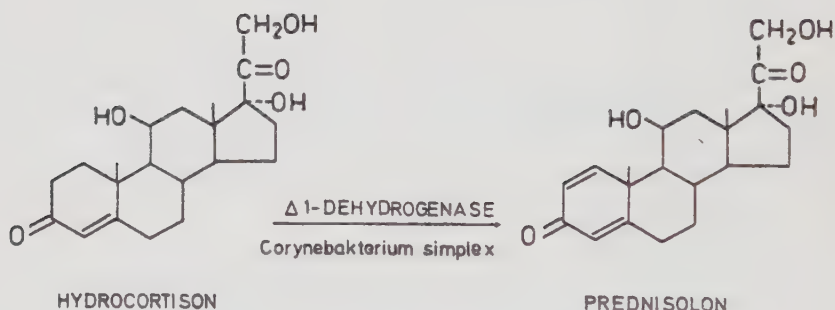
Die Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase von *C. simplex* und *Bacillus sphaericus* katalysiert die Dehydrierung von Hydrocortison (3,20-Dioxo-11 β ,17,21-trihydroxy-4-pregnen) zu Prednisolon (3,20-Dioxo-11 β ,17,21-trihydroxy-1,4-pregnadien (40,41).

Hydrocortison wird seit 1950 zur therapeutischen und palliativen Behandlung von Haut-, Collagen- und Allergie-Erkrankungen verwendet (42).

Da bei der pharmakologischen Behandlung jedoch hohe Dosen des Corticosteroids notwendig sind, hat man durch Herstellung von Derivaten des Hydrocortisons versucht, die bei der Verwendung von hohen Dosierungen auftretenden Nebenwirkungen zu eliminieren. Durch die Herstellung des 1,2-Dehydroderivates konnte die Tendenz zur Natrium- und Wasserretention weitgehend ausgeschlossen und gleichzeitig die antiphlogistischen Eigenschaften um das 4-bis 5-fache erhöht werden.

Prednisolon findet seit 1954 medizinische Anwendungen und wird seither weltweit unter zahlreichen Handelsnamen vertrieben. Allein in der Bundesrepublik Deutschland kommt es unter 16 verschiedenen Bezeichnungen in den pharmazeutischen Handel (43).

Weitere Substrate, die von den *C. simplex*-Zellen umgewandelt werden können, sind in der Literatur angegeben (44).

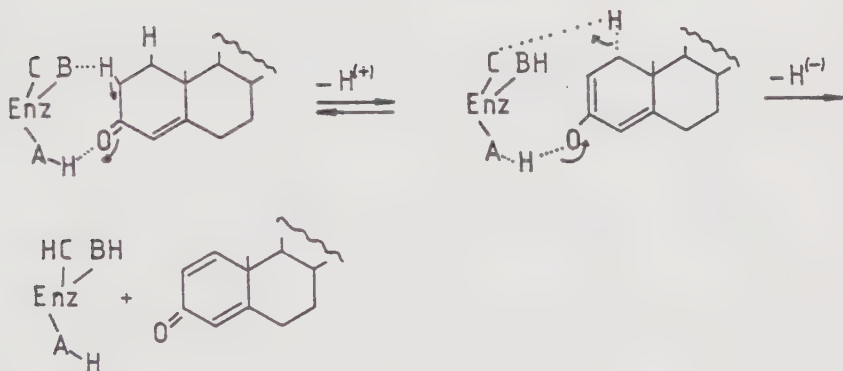


Die $\Delta 1$ -Dehydrogenase (3-Oxo-steroid- $\Delta 1$ -oxydoreductase, E.C. 1.3.99.4) wirkt hauptsächlich an $\Delta 4$ -3-Ketosteroiden und bewirkt an entsprechend strukturierten Steroidmolekülen die Eliminierung von trans-diaxialen 1α , 2β -H-Atomen. Als Cofaktoren dienen Elektronenakzeptoren wie N-Methylphenazonium-methosulfat (45), 2,6-Dichlorophenol-indophenol (46) und verschiedene Chinone wie Menadion (47).

Der kinetische Verlauf der Enzymreaktion wurde von Alberty (48) für ein Enzym-Cofaktor-System, in dem das Enzym in einem oxidierten (E_{ox}) und reduzierten (E_{red}) Zustand vorkommt, folgendermaßen formuliert:



Nach Jerussi und Ringold (47) verläuft der enzymatische Dehydrierungsschritt über eine reversible Enolisierung mit nachfolgender Hydridabspaltung nach dem angegebenen Schema:



A = Protonendonator
 B = Protonenakzeptor
 C = Hydridakzeptor

Mehrere Autoren haben über die Immobilisierung von *C. simplex*-Zellen in Polyacrylamid-Gelen (49,50), Calcium-Alginat (51), Collagen-Membranen (52,53), in Polybutadien-Copolymeren (54), in Polypropylenglykol/Polyethylenglykol (55) und in Polyethylenimin (56) berichtet.

Pseudomonas putida-Zellen wurden bisher nur in Polyacrylamid-Gelen immobilisiert und zur Oxidation von Benzol (57,58) und zur Biotransformation von L-Arginin zu L-Citrullin (59) verwendet.

Hingegen ist bisher eine Immobilisierung von *Bacillus sphaericus*- und *Candida parapsilosis*-Zellen nicht beschrieben worden.

3.2 Reaktionsfähige Polymere zur Immobilisierung von Mikroorganismen auf der Basis von Poly-(vinylalkohol)

3.2.1 Polyfunktionalisierung von Poly-(vinylalkohol) durch Thiolierung mit α -Mercaptocarbonsäuren

Als Ausgangspolymer diente käuflicher Poly-(vinylalkohol) (PVA) mit einem Molekulargewicht von ca. 72 000 D und einem Hydrolysegrad von 98 %.

PVA wird im allgemeinen durch saure oder alkalische Hydrolyse aus Poly-(vinylacetat) hergestellt (60, 61). Nach der Hydrolyse des teilweise verzweigt-strukturierten technisch hergestellten Poly-(vinylacetats) weist der entstehende PVA ein niedrigeres Molekulargewicht auf, da sich die Verzweigungen vor allem an den Acetylgruppen des Poly-(vinylacetats) befinden. Die Hauptkette des Makromoleküls bleibt bei der Hydrolyse erhalten.

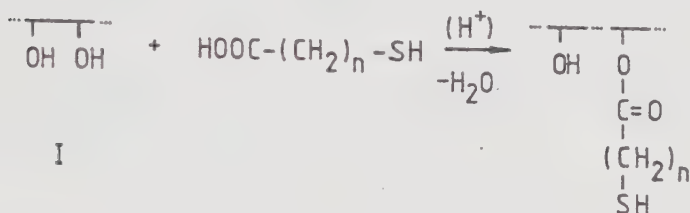
Der übliche Weg über die Polymerisation des Monomeren ist nicht gangbar, da die monomere Einheit Vinylalkohol mit Acetaldehyd im tautomeren Gleichgewicht vorliegt.

PVA stellt ein hochkristallines, lineares Polymer dar. Es ist je nach Polymerisationsgrad mehr oder weniger leicht in Wasser löslich, dagegen in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich. Die Ungiftigkeit des PVA ließ das Polymere für Immobilisierungsreaktionen als besonders geeignet erscheinen.

Das Vorhandensein von freien sekundären Hydroxylgruppen im PVA bietet vielfältige Möglichkeiten zur Veränderung der reaktiven Eigenschaften des Polymeren. Eine Derivatisierung des Makromoleküls kann hauptsächlich durch eine Veretherungs- oder Veresterungsreaktion erfolgen.

Mortenson (62) beschreibt die Derivatisierung von PVA mit Thiolgruppen.

In einer leicht durchzuführenden Veresterungsreaktion wurde PVA I in salzsaurer Lösung mit Thioglykolsäure zum Polymerisat I-A1 und mit 3-Mercaptopropionsäure zum Polymerisat I-A2 mit Thiolgruppen polyfunktionalisiert:



n=1: I-A1

n=2: I-A2

Nach einer 3 stündigen Reaktion bei 90°C und weiteren 12 Stunden bei Raumtemperatur unter Stickstoff-Atmosphäre wurden die Polymerenlösungen mit verdünnter Natronlauge neutralisiert und zur Entfernung von Salzen und nicht umgesetzten niedermolekularen Verbindungen gegen Wasser dialysiert. Die Dialyse erfolgte unter Luft-Ausschluß in Visking-Dialysierschläuchen mit einem mittleren Porenradius von 24 Å oder mit Berghoff-Membranfiltern in einem Membran-Dialysiergerät. Die Ausschlußgrenze betrug bei den verwendeten Dialysierschläuchen 8 000 bis 15 000 D.

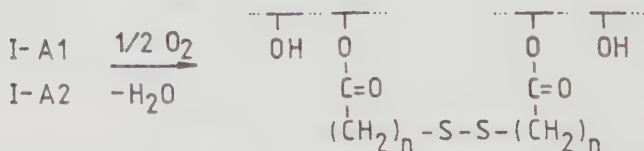
Die Immobilisierungsversuche erfolgten hauptsächlich mit dem mit 3-Mercaptopropionsäure veresterten PVA, da 3-Mercaptopropionsäure leichter zugänglich war und die Eigenschaften des polymeren Produktes sich nicht von dem mit Thioglykolsäure verestertem PVA unterschieden.

Der Gehalt an Thiolgruppen in mit 3-Mercaptopropionsäure verestertem Poly-(vinylalkohol)-Derivat I-A2 wurde mit Ellman's Reagenz 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) ermittelt (63). Der Thiolgruppen-Gehalt betrug hier 0,13 mÄq/g trockenem Polymer.

In dieser Konzentration beeinflussten die reaktiven Thiolgruppen noch nicht die erwünschten hydrophilen Eigenschaften des Polymeren, erlaubten jedoch eine in ausreichend schneller Zeit unter zellphysiologischen Reaktionsbedingungen stattfindende Vernetzungsreaktion.

Durch Zugabe von $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und KH_2PO_4 wurden die Lösungen der Polymeren auf den physiologischen pH-Wert 6,8 gepuffert. Die Konzentration an beiden Phosphat-Komponenten war am Ende je 25 mmol l^{-1} . Der osmotische Druck der polymeren Lösungen sollte nach der Salzzugabe in etwa dem osmotischen Druck in den Zellen entsprechen, um ein Platzen der Zellwände zu verhindern.

Zur Immobilisierungsreaktion gelangte eine 4,4 proz. Lösung der thiolierten Poly-(vinylalkohole) in Phosphat-Puffer. Die auf Glasplatten dünn ausgestrichenen Lösungen der Polymeren I-A1 und I-A2 bildeten bei 2°C in 8 Tagen allein durch oxidative Vernetzung durch den Sauerstoff der Luft über Disulfid-Brücken vernetzte unlösliche Folien. Die Vernetzungsreaktion ist im folgenden Reaktionsschema dargestellt:



$n=1$: I-A1/1

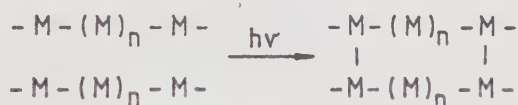
$n=2$: I-A2/1

3.3 Photovernetzbare Polymere zur Immobilisierung von Mikroorganismen

Die Photovernetzung von in Wasser löslichen Polymeren stellt ebenfalls eine schonende Methode zur Immobilisierung von ganzen mikrobiellen Zellen dar. Die Abwesenheit von monomeren Verbindungen, die toxisch auf die zu immobilisierenden Zellen wirken könnten, und die zur Photovernetzung führenden milden Reaktionsbedingungen versprechen eine hohe Aktivitätsausbeute bei den immobilisierten Zellen.

Photovernetzbare Polymere sind Makromoleküle mit photoreaktiven Gruppen, die bei Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge intermolekulare Bindungen eingehen können (64).

Finden die intermolekularen Bindungen zwischen den photoreaktiven Gruppen verschiedener Ketten der Polymeren statt, führt dies zur Netzwerkbildung:



Beispiele für bekannte photosensitive Gruppen, die in Makromoleküle eingebaut werden können, sind:

- olefinische Gruppen
- α, β -ungesättigte Ketone
- α, β -ungesättigte Ester
- Azide
- Carbonsäureazide

Sulfonsäureazide

Diazoketone

Diazonium- oder Tetrazoniumsalze

Photovernetzbare Polymere, die bereits zu Immobilisierungsreaktionen herangezogen wurden, sind in einigen wenigen Fällen von japanischen Arbeitsgruppen beschrieben worden. Beispielsweise wurden photovernetzbare Derivate von Poly-(propylenglykol) und Poly-(ethylenglykol) sowie Derivate von Poly-(butadien) von Fukui (65) synthetisiert.

Tanaka (66) nennt die Photovernetzung von chloracetyliertem PVA.

PVA kann auch ohne zusätzlichen Einbau von photoreaktiven Gruppen durch Bestrahlung mit energiereichen Strahlen in Gegenwart von Photosensibilisatoren zu unlöslichen Netzwerken vernetzt werden. Als Photosensibilisatoren dienen Diazonium- oder Tetrazoniumsalze (67) sowie Derivate der Benzoesäure oder Monochloressigsäure (68).

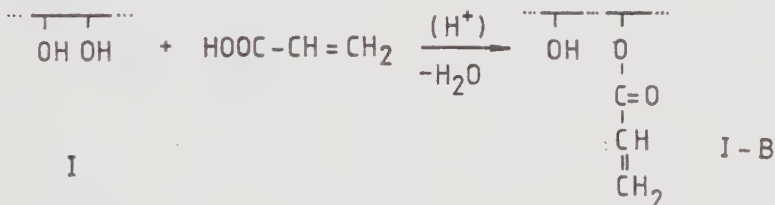
Die bei diesen Vernetzungsreaktionen notwendigen energiereichen Strahlen können jedoch zu einem teilweisen Abbau des Polymeren führen, indem die Hauptkette des Makromoleküls gespalten wird. Vor allem aber besteht die Gefahr, daß die zu immobilisierenden Mikroorganismen unter dem Einfluß energiereicher Strahlen einen Teil ihrer enzymatischen Aktivität verlieren.

Bekannte Beispiele für eine Derivatisierung von PVA mit photovernetzbaren Gruppen sind die Umsetzung von PVA mit Zimtsäurechlorid zu Zimtsäurepolyvinylester (69-71) und die Derivatisierung von PVA mit Phenyl-[α -chlor-benzyl]-keton (Desylchlorid) (72). Beide Derivate sind jedoch in Wasser nur schlecht oder gar nicht löslich und benötigen zur Vernetzungsreaktion energiereiche UV-Strahlen.

3.3.1 Polyfunktionalisierung von Poly-(vinylalkohol) mit photosensitiven α, β -ungesättigten Estergruppen durch Veresterung mit Acrylsäure

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, in PVA photo-sensitive Gruppen einzufügen, die bereits bei Bestrahlen mit sichtbarem Licht zu einer Netzbildung führen. Gleichzeitig sollten die eingeführten photosensitiven Gruppen die Wasserlöslichkeit des polymeren Produktes nicht vermindern.

Durch die polymeranaloge Umsetzung von PVA mit Acrylsäure in salzsaurer Lösung wurde das wasserlösliche Polymerisat I-B mit photosensitiven Eigenschaften synthetisiert, das die folgenden strukturellen Einheiten aufwies:



Es wurden durch Variation des molaren Verhältnisses von Hydroxylgruppen des PVA zu Acrylsäure Photopolymere mit unterschiedlichem Vinylgruppen-Gehalt synthetisiert. Die quantitative Analyse des Vinylierungsgrades erfolgte in Anlehnung an die Methode der Jodzahl-Bestimmung (73). In Tab. 1 ist die Konzentration in mÄq/g der in die polymere Matrix eingeführten Vinylgruppen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Komponenten im Reaktionsansatz dargestellt.

Im IR-Spektrum des vinylierten PVA I-B ist bei 1657 cm^{-1} deutlich die $\text{C}=\text{C}$ -Absorptionsbande der α, β -ungesättigten Estergruppe zu erkennen.

Tab. 1: Vinylgruppen-Gehalt des Polymerisates I-B

Polymerisat-Nr.:	molares Verhältnis Hydroxylgruppen des PVA/Acrylsäure im Reaktionsansatz	Vinylgruppen-Gehalt des Polymerisates (mÄq/g)
I-B1	1 : 1	0,41
I-B2	1 : 2	0,80
I-B3	1 : 4	1,20

Ein Photosensibilisator erweitert im allgemeinen den sensitiven Spektralbereich eines Photopolymers und ermöglicht eine Photovernetzung schon bei langwelligerem Licht.

Riboflavin wurde als Photosensibilisator erfolgreich zur Polymerisation von monomeren Vinylverbindungen eingesetzt (74-76). Während bei den üblichen Polymerisationsinitiatoren die Polymerisation durch die Anwesenheit von Sauerstoff oft verhindert wird, zeigt Riboflavin die Besonderheit, daß eine Polymerisation erst dann ausgelöst wird, wenn Sauerstoff zugegen ist. Unter Sauerstoff-Ausschluß wird Riboflavin bei Bestrahlung zu seiner Leukoform photoreduziert.

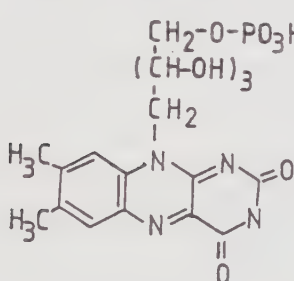
Die Initiierung der Polymerisation in Gegenwart von Luft-Sauerstoff erfolgt nach dem von Oster (74) formulierten Mechanismus:



Die reduzierte Form des Riboflavin reagiert bei Bestrahlung mit atmosphärischem Sauerstoff zur semichinoiden Form des Riboflavins unter Bildung von freien Hydroxylradikalen.

Die entstehenden Radikale führen dann im Falle des vinylierten PVA I-B zur vernetzenden Polymerisation der Vinylgruppen des Polymeren. Als Reduktionsmittel fungiert die im Riboflavin enthaltene Ribose-Gruppe.

Riboflavin absorbiert im ultravioletten sowie im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums bei 225 nm, 269 nm, 372 nm, 445 nm und 565 nm. Die Absorption wird durch den Isoalloxazinrest hervorgerufen und ist daher für alle Flavine charakteristisch (77). Um die geringe Wasserlöslichkeit des Riboflavins von 12 mg/100 ml zu umgehen, konnte daher auch das wasserlösliche Riboflavin-5'-phosphat Na-Salz als Photosensibilisator verwendet werden.



Riboflavin-5'-phosphat
Na-Salz

Im Riboflavin (Vitamin B₂) und das in seinen Eigenschaften vergleichbaren Riboflavin-5'-phosphat (Flavinmononucleotid, FMN) wurde eine Photosensibilisator mit guter zellphysiologischer Verträglichkeit gefunden.

Für zahlreiche Hefen und Bakterienstämme, darunter auch Corynebakterien, ist Riboflavin Bestandteil der Zellen (78,79). Jerussi und Ringold (47) nehmen an, daß es sich um den enzymgebundenen Elektronenakzeptor der Δ^1 -Dehydrogenase ebenfalls um ein Flavin handelt.

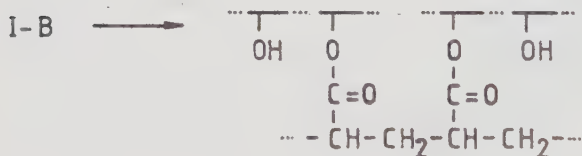
Die photosensitiven α, β -ungesättigten Estergruppierungen des Polymerisates I-B ermöglichten in Gegenwart von Riboflavin-5'-phosphat bereits eine Netzwerk-Bildung durch Bestrahlen mit sichtbarem Licht.

Das dünn auf einer Glasplatte ausgestrichene Polymerisat I-B bildete nach 3-stündigem Bestrahlen mit dem sichtbaren Licht einer 250 Watt Lampe durch die Photovernetzungsreaktion die mechanisch stabile Folie I-B/1.

Die Photovernetzung von I-B erfolgte bei Bestrahlen mit dem ultravioletten Licht einer 300 Watt Photolampe bereits nach 1 Stunde zu I-B/2.

Die Temperatur im Strahlengang der Photolampen wurde durch Kühlung auf maximal 25°C begrenzt, um einen Aktivitätsverlust der Mikroorganismen durch thermische Belastung auszuschließen.

Die Struktur des vernetzten vinylierten PVA-Derivates I-B ist im folgenden Schema dargestellt:



$h\nu_{\text{vis}}$: I - B/1

$h\nu_{\text{UV}}$: I - B/2

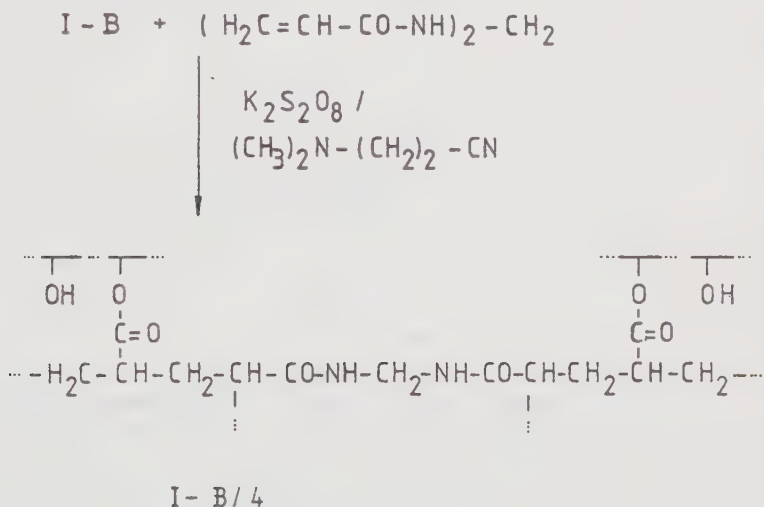
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: I- B/3

In Abwesenheit des Photosensibilisators wurde auch bei Bestrahlung mit UV-Licht keine Vernetzungsreaktion beobachtet. Eine Netzwerkbildung fand auch dann nicht statt, wenn das mit dem Photosensibilisator vermengte Polymerisat unter Lichtausschluß aufbewahrt wurde.

Die α, β -ungesättigten Estergruppierungen im Polymerisat I-B erlauben neben der photochemischen Vernetzung auch eine Netzwurkbildung durch eine radikalisch initiierte Vernetzungsreaktion.

Die radikalische Initiierung mit $K_2S_2O_8$ und 3-(Dimethylamino)-propionitril führte bei Raumtemperatur innerhalb von 2 Min. zu dem gelartigen Reaktionsprodukt I-B/3.

Die Veränderung des Polymerisates I-B durch die Zugabe des niedermolekularen bifunktionellen Vernetzer N,N'-Methylen-diacrylamid führte nach Zusatz der Initiatoren in 1 bis 2 Min. zu einer Vernetzung, wobei das polymere Reaktionsprodukt I-B/4 erwartet werden konnte:

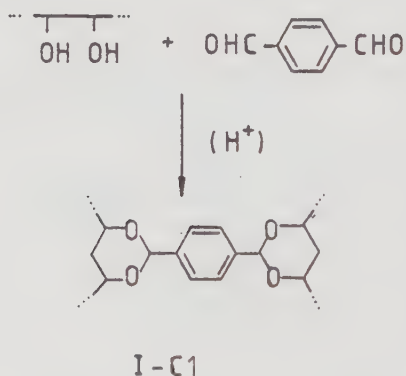


Der hier verwendete Initiator und das Vernetzungsreagenz werden häufig bei der vernetzenden Polymerisation von Acrylamid und damit auch zur Herstellung von Immobilisaten auf der Basis von Poly-(acrylamid) verwendet (80).

3.4 Vernetzung von Poly-(vinylalkohol) mit bifunktionellen und polyfunktionellen Aldehyden durch Acetalbildung

PVA kann mit bifunktionellen und polyfunktionellen Aldehyden in einer Acetalisierungsreaktion zu einem unlöslichen polymeren Produkt vernetzt werden.

Als bifunktioneller Aldehyd wurde Terephthalaldehyd als Vernetzungsreagenz mit PVA zum polymeren Produkt I-C1 nach einer von Kuhn und Balmer (81) beschriebenen Methode umgesetzt.



In einer analogen Reaktion wurde als polyfunktioneller Aldehyd Poly-(acrolein) mit PVA zum unlöslichen Produkt I-C2 umgesetzt. Poly-(acrolein) wurde in einer wasserlöslichen Form als Bisulfit-Additionsverbindung zur Vernetzungsreaktion eingesetzt.

Die vernetzende Acetalisierungsreaktion erfolgte jedoch mit beiden Aldehydverbindungen nur bei niedrigen pH-Werten mit ausreichender Geschwindigkeit. Während bei einem pH-Wert von 1 die Gelbildung innerhalb kurzer Zeit eintrat, war die vollständige Vernetzung zum Polymerisat I-C1 bei pH 2 erst

nach 3 Tagen und bei pH 3 erst nach 6 Tagen abgeschlossen.
Die Vernetzungsreaktion des PVA mit Poly-(acrolein) dauerte
wesentlich länger.

Eine Vernetzung des PVA mit den Aldehydverbindungen bei einem
für die Mikroorganismen physiologisch vertretbaren pH-Wert
um den Neutralpunkt war nicht möglich.

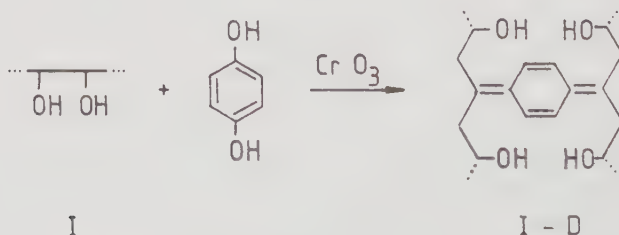
3.5 Vernetzung von Poly-(vinylalkohol) durch in situ hergestelltes p-Benzochinon

Polymere mit aktiven Methylengruppen wie Poly-(vinylacetat), Poly-(vinylchlorid), Polystyrol oder Poly-(vinylalkohol) können bei Raumtemperatur mit niedermolekularen Reagenzien, die in ihrer oxidierten Form eine chinoid Struktur zeigen, zu unlöslichen polymeren Reaktionsprodukten vernetzt werden.

Nach einem von Hagg (82) angegebenen Verfahren wird die chinoid Vernetzungskomponente durch Reaktion der entsprechenden reduzierten Verbindung des Chinons durch Oxidation in situ hergestellt.

Als Oxidationsmittel eignen sich nur starke Oxidationsmittel wie CrO_3 oder KMnO_4 .

Die in Gegenwart von Hydrochinon und Chrom(VI)oxid stattfindende Vernetzungsreaktion von PVA wurde von Hagg angegeben und ist im folgenden Schema dargestellt:



Nach der unter Lichtausschluß durchgeführten Zugabe der Reagenzien zum in Wasser gelösten PVA trat innerhalb von etwa 1/2 Min. unter intensiver Schwarzfärbung die Gelbildung zum polymeren Produkt I-D ein.

3.6 Veresterung von Poly-(vinylalkohol) mit Zimtsäurechlorid zu hydrophoben Zimtsäurepolyvinylester und dessen photochemische Vernetzung

Bei Biotransformationsreaktionen von hydrophoben Substanzen wie Terpenoiden, Steroiden oder bei den Umwandlungen verschiedener organischer Verbindungen kann es vorteilhaft sein, hydrophobe Gele zur Immobilisierung von Mikroorganismen zu verwenden. Ebenso können in Reaktionssystemen, die organische Lösungsmittel enthalten, hydrophobe Gele wegen der Affinität und der Permeabilität des wasserunlöslichen Substrates zur polymeren Matrix effektiver als hydrophile Gele sein.

Verschiedentlich wurde bereits von hydrophoben Polymeren, die zur Immobilisierung von Mikroorganismen verwendet wurden, berichtet (83).

In einem Orientierungsversuch wurde in der vorliegenden Arbeit die Eignung eines wasserunlöslichen PVA-Derivates zur Immobilisierung von *C. simplex*-Zellen überprüft.

Aus PVA und Zimtsäurechlorid wurde nach einer modifizierten Schotten-Baumann-Reaktion Zimtsäurepolyvinylester I-E synthetisiert (84).

In Ethylmethylketon/Benzol gelöstes Zimtsäurechlorid wurde bei niedriger Temperatur zu einer alkalischen Lösung von PVA gegeben. Der entstandene Zimtsäurepolyvinylester I-E löste sich nach erfolgter Grenzflächenreaktion in der organischen Phase und wurde daraus isoliert.

Dem Polymer wurde 4,4'-Bis-(dimethylamino)-benzophenon (Michler's Keton) zugesetzt. Das Benzophenon-Derivat wirkt hier als Photosensibilisator und verschiebt die Absorption in den langwelligeren Bereich.

Nach 2-stündigem Bestrahlen der auf einer Glasplatte dünn ausgestrichenen polymeren Mischung mit einer UV-Photolampe wurde das vernetzte Polymer I-E/1 als mechanisch stabile Folie erhalten.

Der Zimtsäurepolyvinylester I-E wurde als 8 proz. Lösung in Dimethylformamid (DMF) und als 13 proz. Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Immobilisierung von C. simplex-Zellen verwendet.

IR-Absorptionen und Bandenzuordnung
von Zimtsäurepolyvinylester I-E

<u>Absorptionsbereich</u> (cm^{-1})	<u>Zuordnung</u>
3065, 3030	✓ (Aryl-H und $-\text{C}=\text{CH}$)
1495	✓ (Aromat)
765	✓ (Substitutionsmuster des Benzolringes, monosubst.)

3.7 Reaktionsfähige Polymere zur Immobilisierung von Mikroorganismen auf der Basis von Poly-(acrylsäurehydrazid) und Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren

3.7.1 Herstellung von Poly-(acrylsäuremethylester) und Acrylsäuremethylester-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren

Entstabilisierter Acrylsäuremethylester wurde in wäßriger Lösung in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat als Emulgator und $K_2S_2O_8$ als Initiator zu Poly-(acrylsäuremethylester) II polymerisiert (86).

Durch die Copolymerisation von Acrylsäuremethylester und N-Vinylpyrrolidon in verschiedenen molaren Verhältnissen wurde das Copolymer II-co in unterschiedlicher Zusammensetzung hergestellt.

Zur Copolymerisation mit Acrylsäuremethylester wurde N-Vinylpyrrolidon eingesetzt, da es eine hydrophile, im wesentlichen inerte Polymerkomponente darstellt und darüberhinaus für seine geringen toxischen Eigenschaften bekannt ist.

Die radikalische Polymerisation eines Gemisches aus zwei Monomeren M_1 und M_2 wird durch die Copolymerisationsgleichung 2 beschrieben:

$$(2) \quad \frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{r_1 \cdot ([M_1] / [M_2]) + 1}{r_2 \cdot ([M_2] / [M_1]) + 1}$$

Nach dieser Beziehung kann für jedes beliebige Monomerenverhältnis $[M_1] / [M_2]$ die Zusammensetzung des daraus entstehenden Copolymerisates $d[M_1] / [M_2]$ errechnet werden, wenn die experimentell bestimmbaren Copolymerisationsparameter r_1 und r_2 bekannt sind.

Eine nähere Erläuterung der Copolymerisationsgleichung findet sich in Lehrbüchern und der Literatur (87,88).

Die Copolymerisationsparameter r für das Monomerenpaar Acrylsäuremethylester (r_1) und N-Vinylpyrrolidon (r_2) lauten (89):

$$r_1 = 0,27 \pm 0,16$$

$$r_2 = 0,041 \pm 0,024$$

Während die Copolymerisationsparameter definitionsgemäß eine Aussage über die relative Additionsbereitschaft zweier Monomere gegenüber einem Kettenradikal erlauben, wird die absolute Reaktionsbereitschaft eines Monomeren nach dem von Alfrey und Price formulierten Q-e-Schema beschrieben. Der rechnerische Zusammenhang zwischen den Copolymerisationsparametern r_1 und r_2 wird durch Gl. 3 erfaßt:

$$(3) \quad r_1 = (Q_1/Q_2) \exp(e_2 - e_1) e_1$$

$$r_2 = (Q_2/Q_1) \exp(e_1 - e_2) e_2$$

Die Q-e-Werte für Acrylsäuremethylester sind

$$Q = 0,46 \quad e = 0,6 \quad (90)$$

und für N-Vinylpyrrolidon

$$Q = 0,11, \quad e = -1,64 \quad (91)$$

$$\text{bzw. } Q = 0,093 \quad e = -1,17 \quad (92)$$

Das Q-e-Modell beruht auf dem Postulat, daß die Aktivierungsenergie eines Wachstumsschrittes durch den Grad der Resonanzstabilisierung des Ausgangs- und des Endradikals und durch die effektiven partiellen Ladungen der Reaktionspartner bestimmt wird. Die Additionsneigung eines Monomeren an das Kettenradikalende wird durch die Änderung der Resonanzstabilisierung und des aus der Neutralisation der Ladungen resultierenden Energiegewinns beeinflusst.

Diese stark vereinfachten Annahmen ermöglichen wegen des Nichterfassens von sterischen Faktoren und Lösungsmittel-einflüssen zwar keine quantitativen Aussagen, erlauben aber eine qualitative Schlußfolgerung bei der Copolymerisation zweier Monomere.

Die Q-e-Werte des Monomerenpaares Acrylsäuremethylester und N-Vinylpyrrolidon deuten auf einen alternierenden Einbau der Monomeren in das Copolymerisat II-co hin.

In Tab. 2 ist die Zusammensetzung der monomeren Komponenten Acrylsäuremethylester und N-Vinylpyrrolidon im Polymerisationsansatz angegeben.

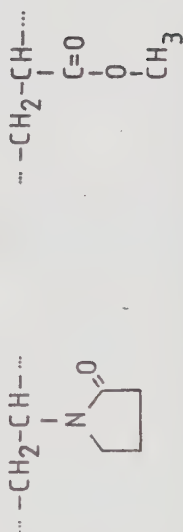
Die Zusammensetzung der Polymerisate II und II-co ist- ausgedrückt in Molprozenten- in Tab. 3 wiedergegeben (errechnet aus den in Tab. 21 im Experimentellen Teil angegebenen Daten der Elementaranalyse).

Wie aus dem Vergleich der Zusammensetzung der Polymerisate in Tab. 3 mit der Zusammensetzung der monomeren Komponenten im Reaktionsansatz aus Tab. 2 hervorgeht, reagierten die monomeren Komponenten zu ihren polymeren Produkten im Verhältnis ihrer molaren Zusammensetzung im Reaktionsansatz.

Tab. 2: Molare Zusammensetzung der monomeren Komponenten Acrylsäuremethylester und N-Vinylpyrrolidon zur Herstellung von Poly-(acrylsäuremethylester) II und Acrylsäuremethylester-N-Vinylpyrrolidon-Copolymer II-co

Polymerisat-Nr.:	Acrylsäure-methylester	N-Vinylpyrrolidon	Acrylsäuremethylester/ N-Vinylpyrrolidon im Reaktionsansatz	
II	25 277	- -		ml mmol
II-co1	25 277	29,5 277	1 : 1	ml mmol
II-co2	10 111	3,9 37,0	3 : 1	ml mmol
II-co3	10 111	1,3 12,4	9 : 1	ml mmol

Tab. 3: Zusammensetzung von Poly-(acrylsäuremethylester) II und von den
Acrylsäuremethylester-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren II-co



Polymerisat- Nr.:	N-Vinylpyrrolidon- Einheiten	Acrylsäuremethylester- Einheiten	Mol-%
II	0	100	Mol-%
II-co1	43,5	56,5	Mol-%
II-co2	24,5	75,5	Mol-%
II-co3	10,5	89,5	Mol-%

IR-Absorptionen und Bandenzuordnung von

Poly-(acrylsäuremethylester) II

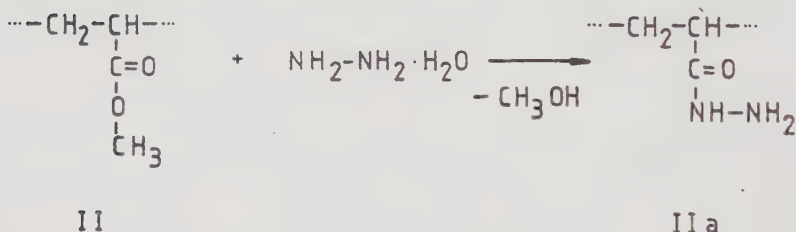
<u>Absorptionsbereich (cm^{-1})</u>	<u>Zuordnung</u>
2963	ν ($-\text{CH}_2$)
2860	ν ($-\text{OCH}_3$)
1735	ν ($-\text{COOCH}_3$)
1450	ν ($-\text{CH}_2$)

Acrylsäuremethylester-N-Vinylpyrrolidon-Copolymer II-co

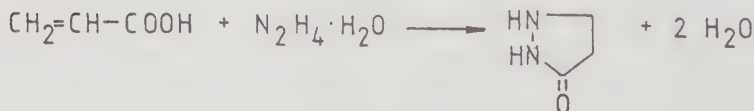
2960	ν ($-\text{CH}_2$)
1735	ν ($-\text{COOCH}_3$)
1685	ν (Lactam-5-Ring)
1425	ν ($-\text{CH}_2$)

3.7.2 Darstellung der Hydrazide der Poly-(acrylsäure)- Derivate

Poly-(acrylsäuremethylester) II und die Copolymeren II-co wurden mit Hydrazinhydrat in einer polymeranalogen Reaktion zu ihren wasserlöslichen polymeren Säurehydraziden IIa und II-co/a umgesetzt (93).

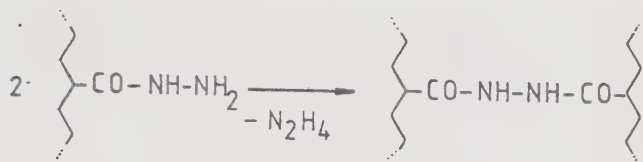


Poly-(acrylsäurehydrazid) kann nicht durch Polymerisation von Acrylsäurehydrazid-Monomeren erhalten werden, da Acrylsäure bei der Umsetzung mit Hydrazinhydrat zu Pyrazolidon reagiert(94).



In Wasser lösliche Poly-(acrylsäurehydrazide) wurden nur erhalten, wenn die Umsetzungen unter milden Reaktionsbedingungen und bei einem etwa 10-fachen Überschuß an Hydrazinhydrat durchgeführt wurden. Bei höheren Temperaturen

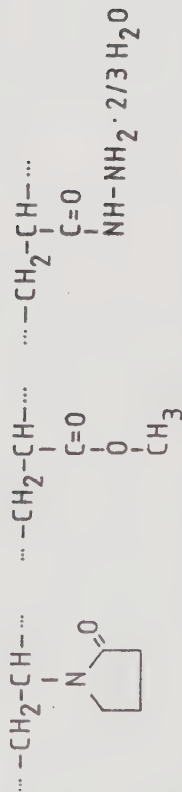
und längeren Reaktionszeiten reagieren Säurehydrazide unter Abspaltung von Hydrazin zu sekundären Hydraziden (95). Für makromolekulare Verbindungen bedeutet die intermolekulare Bildung sekundärer Hydrazide nach folgendem Reaktionsschema eine Vernetzung zu unlöslichen polymeren Produkten:



Die elementaranalytische Untersuchung der polymeren Säurehydrazide ergab für den Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalt stets zu niedrige und für den Wasserstoff-Gehalt zu hohe Werte. Erklärt werden können die Abweichungen durch einen Anteil von etwa 10 % Wasser in den polymeren Produkten. Das Wasser wird wahrscheinlich durch Hydratbildung gebunden und läßt sich auch durch scharfes Trocknen nicht entfernen. Bei der Berechnung der elementaranalytischen Zusammensetzung der polymeren Säurehydrazide wurde daher in allen Fällen ein Wassergehalt von 2/3 Äq. Wasser/ Äq. Hydrazid berücksichtigt.

Für die Zusammensetzung des Poly-(acrylsäurehydrazids) IIa und der Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren II-co/a ergaben sich aus den Daten der elementaranalytischen Untersuchung (s. Exp. Teil, Tab. 22) die in Tab. 4 angegebenen Werte - ausgedrückt in Molprozenten.

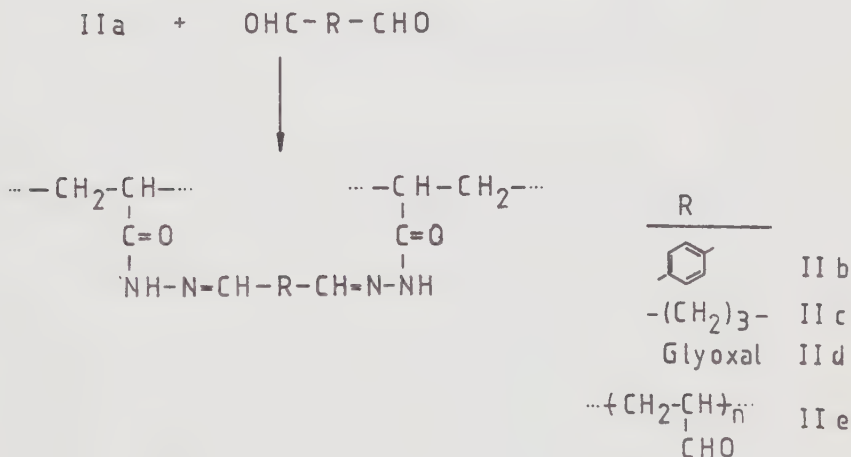
Tab. 4: Zusammensetzung von Poly-(acrylsäurehydrazid) IIa und den Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren II-co/a



Polymerisat-Nr.:	N-Vinylpyrrolidon-Einheiten	Acrylsäuremethylester-Einheiten	Acrylsäurehydrazid-Einheiten	Mol-%
IIa	0	10,0	90,0	Mol-%
II-co1a	43,5	39,0	17,5	Mol-%
II-co2a	24,5	0	75,5	Mol-%
II-co3a	10,0	28,0	62,0	Mol-%

3.7.3 Vernetzung von Poly-(acrylsäurehydrazid) und
Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymer
durch Hydrazenbildung mit monomeren bifunktionellen
und polymeren polyfunktionellen Aldehyden

Poly-(acrylsäurehydrazid) IIa konnte mit monomeren bifunktionellen und polymeren polyfunktionellen Aldehyden zu unlöslichen makromolekularen Hydrazonverbindungen vernetzt werden.



Zur Vernetzungsreaktion wurden Terephthalaldehyd, Glyoxal und Glutardialdehyd verwendet. Als polymerer Aldehyd wurde Poly-(acrolein) als wasserlösliche Bisulfit-Additionsverbindungen eingesetzt (Tab. 5).

Hier erwies sich nur das mit Terephthalaldehyd vernetzte polymere Hydrazon IIb als mechanisch stabiles Produkt.

Tab. 5: Vernetzung von Poly-(acrylsäurehydrazid) IIa mit bifunktionellen und polyfunktionellen Aldehyden zu den polymeren Säurehydrazonen

Polymerisat-Nr.:	IIb	IIc	IIId	IIe	
Poly-(acrylsäurehydrazid) IIa	10				ml
(9,9 mÄq/g,	1,0				mmol
1 proz. wäßr. Lösung)					
Terephthalaldehyd	133				mg
	1,0				mmol
Glutardialdehyd		0,40			ml
(25 proz. wäßr. Lösung)		1,0			mmol
Glyoxal			0,165		ml
(30 proz. wäßr. Lösung)			1,0		mmol
Poly-(acrolein)				350	mg
(7,7 mÄq/g)				2,7	mmol

Die Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren II-co/a wurden daher ausschließlich mit Terephthalaldehyd zu ihren unlöslichen polymeren Hydrazonverbindungen II-co/b umgesetzt. Die Vernetzung der copolymeren Säurehydrazide erfolgte mit 1,3 g Terephthalaldehyd/g Copolymerisat. Höhere Vernetzerkonzentrationen führten zu einer Verringerung der enzymatischen Aktivität der eingeschlossenen Zellen. Die Vernetzungsreaktionen erfolgten bei Raumtemperatur innerhalb weniger Minuten nach Zugabe der Vernetzungskomponenten. Um die polymeren Verbindungen in wäßriger Lösung möglichst konzentriert zu den Immobilisierungen einsetzen zu können und um den Zusatz organischer Lösungsmittel zu vermeiden, erwies es sich als vorteilhaft, den Vernetzer Terephthalaldehyd zu den in Wasser gelösten Polymeren in fester Form hinzuzufügen.

Die mit Terephthalaldehyd vernetzten polymeren Reaktionsprodukte zeigten aufgrund ihres konjugierten π -Elektronensystems eine grün-gelbe Färbung.

IR-Absorptionen und Bandenzuordnung von

Poly-(acrylsäurehydrazon) mit Terephthalaldehyd vernetzt IIb

<u>Absorptionsbereich (cm^{-1})</u>	<u>Zuordnung</u>
3240	$\checkmark$ (-CONH)
2935	$\checkmark$ (-CH ₂)
1680 (breite Bande)	$\checkmark$ (-CONH) und $\checkmark$ (-C=N)
1605, 1550	$\checkmark$ (Aromat)
1450	$\checkmark$ (-CH ₂)
830	$\checkmark$ (Substitutionsmuster des Benzolringes, para- disubstituiert)

3.8 Immobilisierung von Mikroorganismen durch Einschluß in die reaktiven Polymerisate

Die Immobilisierung der in 3.1 beschriebenen Mikroorganismen erfolgte in allen Fällen nach der Einschlußmethode unter nicht sterilen Reaktionsbedingungen.

Die zu immobilisierenden Mikroorganismen wurden als Trockenpulver oder als Zellsuspension in Phosphat-Puffer ($25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und $25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, pH 6,8) zu den in Wasser oder Phosphat-Puffer gelösten Polymeren gegeben.

Im allgemeinen war es günstig, das Flüssigkeitsvolumen der Polymer-Zell-Suspension gering zu halten, um ein möglichst vollständiges Einschließen der Zellen in den polymeren Gelen zu gewährleisten.

Die Zellsuspensionen wurden üblicherweise mit einem schnell drehenden Rührer (Ultra Turrax) bei 20 000 U/min weitgehend homogenisiert, um das Einschließen von unregelmäßigen Zellhaufen zu vermeiden. Das sorgfältige Vermischen der Polymerenlösungen mit den Zellsuspensionen und den Vernetzungsreagenzien erfolgte durch Rühren mit einem Metrohm-Rührer. Hier sollte die Kontaktzeit zwischen den Mikroorganismen und den Immobilisierungsreagenzien kurz sein, um toxische Einflüsse zu vermeiden.

Die mit den Polymerisaten I-A1, I-A2, I-B/1, I-B/2 und I-E hergestellten Immobilisate fielen als Folien an. Die Corynebakterium simplex- und Bacillus sphaericus-Immobilisate wurden 24 Stunden bei Raumtemperatur oder bei niedrigeren Temperaturen mit Phosphat-Puffer (pH 6,8) im Rotationsschüttler bei 160 U/min gewaschen und anschließend lyophilisiert. Die lyophilisierten Immobilisat-Folien wurden auf eine geeignete Größe zerschnitten bzw. zerrieben. Die Größe der zur Aktivitätsbestimmung verwendeten

Immobilisatproben betrug bei den I-A und I-E - Immobilisaten ca. 25 mm^2 bei einer Foliendicke von ca. 0,2 mm und bei den I-B/1 und I-B/2 - Immobilisaten 1 bis 9 mm^2 mit einer Dicke von etwa 0,1 mm.

Die mit den Polymerisaten I-B/3, I-B/4, I-C1, I-C2, I-D und II-co/b hergestellten Immobilisate zeigten im feuchten Zustand eine weiche Gelstruktur und wurden durch ein Sieb mit der Maschenweite von 0,8 mm gepreßt, um kleinere Immobilisatpartikel zu erhalten.

Die mit dem Polymerisat IIb hergestellten Immobilisate entstanden während der Vernetzungsreaktion als unregelmäßig geformte Partikel unterschiedlicher Größe, die in Kornfraktionen von 0,05 - 0,1 mm, 0,1 - 0,2 mm und 0,2 - 0,5 mm Maschenweite feucht ausgesiebt wurden.

Die *C. simplex*- und *Bacillus sphaericus*-Immobilisate wurden bis zur Aktivitätsbestimmung bei -20°C bis -25°C gelagert. Im Falle der *C. simplex*-Immobilisate wurde bei dieser Lagerbedingung innerhalb von 6 Monaten kein Abfall der enzymatischen Aktivität festgestellt.

Die *Pseudomonas*- und *Candida*-Immobilisate wurden ebenfalls wie oben beschrieben 24 Stunden gewaschen. Diese Immobilisate wurden im feuchten Zustand bei 4°C oder bei Raumtemperatur bis zur Aktivitätsbestimmung gelagert.

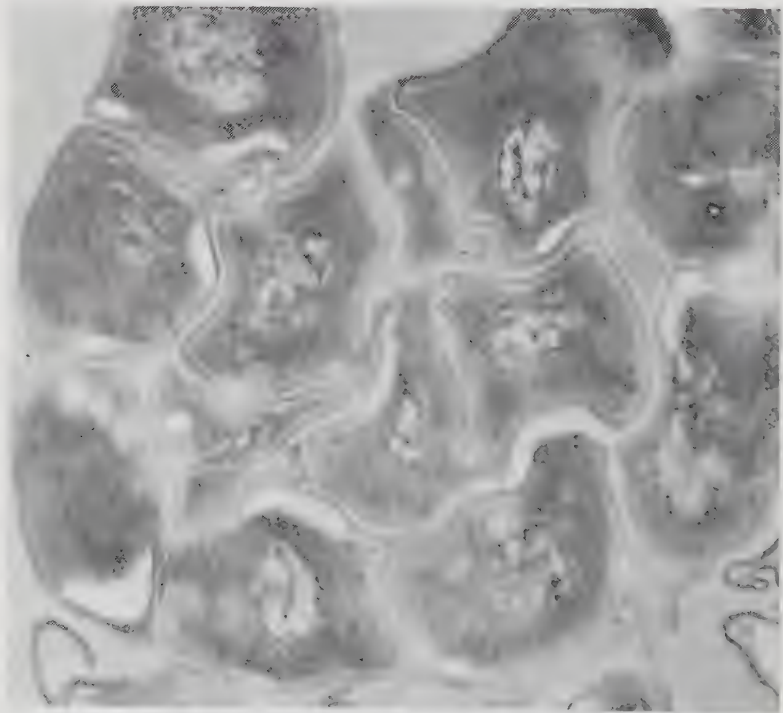
Das Verhältnis von Trockengewicht/Feuchtgewicht betrug bei den Immobilisaten etwa 1 : 8 bis 1 : 10.

Das Quellungsverhalten der lyophilisierten Immobilisate wurde in Phosphat- Puffer (pH 6,8) bestimmt. Bei der Quellung vergrößerte sich das Eigenvolumen der Immobilisatpartikel um das 1,4 bis 2,5-fache ihres Trockenvolumens.

Die im folgenden zur Kennzeichnung der Immobilisate benutzte Nomenklatur beinhaltet das zur Einschlußreaktion verwendete Polymerisat unter Nennung der immobilisierten Mikroorganismen.

Die Abb. 3 und 4 zeigen die in den Polymerisaten I-A2/1 und I-B1/1 eingeschlossenen *C. simplex*-Zellen in einer elektronenmikroskopischen Dünnschnitt-Aufnahme bei 25 000 facher Vergrößerung.

Abb. 3: Elektronenmikroskopische Dünnschnitt-Aufnahme immobilisierter *C. simplex*-Zellen



Immobilisat: I-A2/1-*C. simplex*
Vergrößerung: 25 000; Fix.: Osmium/Chrom;
Einb.: Spurr; Kontrast.: UAZ/Pb

Es ist zu erkennen, daß die *C. simplex*-Zellen im immobilisierten Zustand im Falle des Immobilisates I-A2/1 eine leichte Deformierung der Zellwand erfahren haben. Die auf die Zellwand der Mikroorganismen wirkenden Kräfte während der Immobilisierungsreaktion werden durch die Art und die Dauer der Vernetzungsreaktion bestimmt und wirken sich beim Immobilisat I-A2/1 deutlicher aus als bei Immobilisat I-B1/1, da bei Immobilisat I-A2/1 die Vernetzung 8 Tage, dagegen beim Immobilisat I-B1/1 nur 3 Stunden dauert.

Abb. 4: Elektronenmikroskopische Dünnschnitt-Aufnahme immobilisierter *C. simplex*-Zellen



Immobilisat: I-B1/1-*C. simplex*

Vergrößerung und Aufnahmetechnik wie in Abb. 3 angegeben.

3.9 Methoden zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der immobilisierten Mikroorganismen

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der immobilisierten *Pseudomonas putida*- und *Candida parapsilosis*-Zellen bei den Biotransformationsreaktionen wurden von Herrn Prof. Dr. H. J. Rehm am Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster durchgeführt.

Die Bestimmung der Aktivität der freien und immobilisierten *Corynebakterium simplex*- und *Bacillus sphaericus*-Zellen bei den Steroidumwandlungsreaktionen erfolgte hauptsächlich diskontinuierlich mittels Differential-Pulspolarographie. Als weitere analytische Methoden eigneten sich für die Verfolgung des zeitlichen Verlaufes der Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), die Dünnschichtchromatographie und die UV-Spektroskopie (Einzelheiten siehe Exp. Teil 4.6).

3.10 Einfluß der Enzyminduktion auf die Steroid- Δ^1 - Dehydrogenase-Aktivität der C. simplex-Immobilisate

Vor der Steroidumwandlung wurden die C. simplex-Immobilisatproben in Hydrocortison-Lösungen inkubiert.

Die Inkubation bewirkte bei den immobilisierten C. simplex-Zellen eine Enzyminduktion.

Auf eine Inkubation der freien C. simplex-Zellen wurde wegen der Gefahr einer Kontamination durch fremde Keime verzichtet. Eine Kontamination der immobilisierten Zellen durch andere Keime scheint durch das die Zellen umgebende polymere Netzwerk verhindert zu werden.

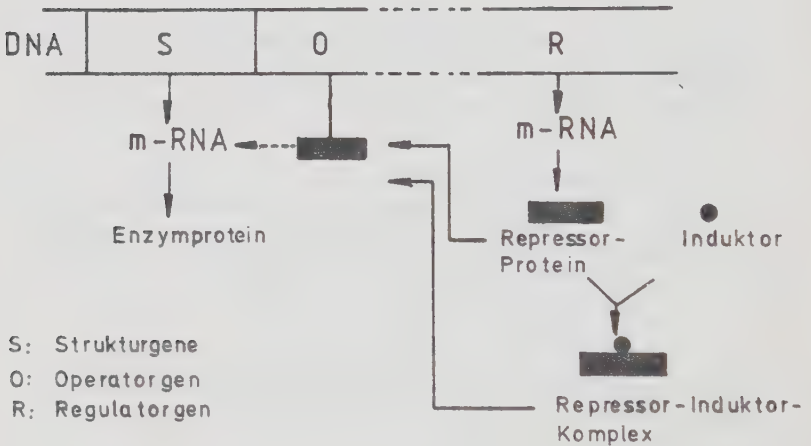
Unter Enzyminduktion ist die verstärkte Bildung von Enzymen zu verstehen, die ausgelöst wird, wenn Substratmoleküle als Induktoren in die Zelle gelangen. Die Enzyminduktion ist eine Folge der Regulation der Genaktivität. Nach einem von Jacob und Monod (96) aus Untersuchungen an E. coli entwickelten Regulationsmodell unterliegt die Synthese von Enzymen einem Regulationsmechanismus, an dem Struktur-Gene, das Operator-Gen und das Regulator-Gen einer DNA-Kette beteiligt sind. Während die Struktur-Gene die Struktur der Proteine determinieren und das Operator-Gen eine Regulationsfunktion bei der Proteinbiosynthese ausübt, bildet das Regulator-Gen ein Repressor-Protein, das spezifisch mit dem Operator-Gen reagiert und dieses blockiert. Der Repressor in seiner aktiven Form verhindert dadurch die Synthese von m-RNA. Daher wird die Transskription der Struktur-Gene unterbunden.

Die ebenfalls ausgeprägte Spezifität des Repressors für den Enzym-Induktor (Substrat oder Substrat-Analogen) führt bei Anwesenheit eines Induktors zur Bildung eines Repressor-Induktor-Komplexes; Das Repressor-Protein erfährt bei der Bindung des Induktormoleküls eine Änderung seiner Konformation, so daß der Repressor-Induktor-Komplex nicht mehr in der Lage ist, das Operator-Gen zu blockieren: Die Synthese der m-RNA (Transskription) und damit der entsprechenden Enzyme kann nun

ungehindert ablaufen.

Das induzierte Enzym ist dabei identisch mit dem normalerweise in der Zelle vorhandenen Enzym.

Abb. 5: Regulationsmechanismus der Enzyminduktion (97)



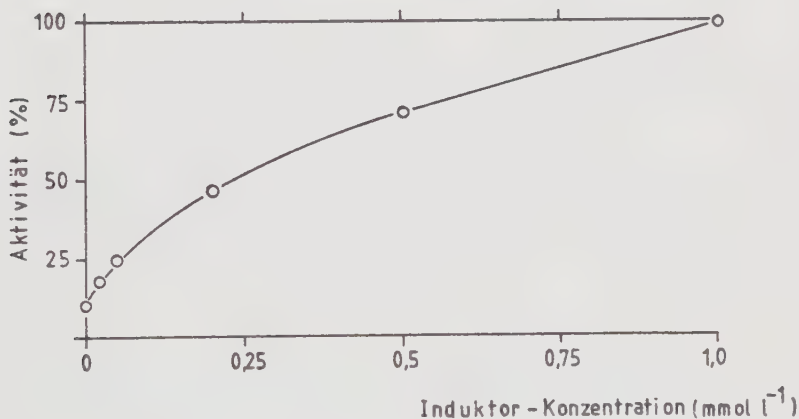
Die Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase der *C. simplex*-Zellen ist nach Udvardy (98) ein induzierbares Enzym und wird auch in vom Wachstum entkoppelten Mikroorganismen induziert.

Als Induktoren wirken Steroidhormone wie beispielsweise Hydrocortison. Die Geschwindigkeit der Enzymsynthese wird durch Methanol und DMF erhöht, wahrscheinlich indem die Wasserlöslichkeit der Steroidhormone und damit der passive Transport des Induktors in die Zelle begünstigt wird (39).

Die optimale Induktorkonzentration und die günstigste Inkubationsdauer wurden mit den C. simplex-Immobilisaten untersucht.

In Abb. 6 ist die Aktivität in % der hier ermittelten maximalen Aktivität der C. simplex-Immobilisate in Abhängigkeit der Hydrocortison-Induktorkonzentration dargestellt. Die Inkubation erfolgte hier in 24 Stunden in 50 ml Phosphat-Puffer (pH 6,8) mit 1 % DMF-Anteil bei 30°C und 160 U/min.

Abb. 6: Aktivität der C. simplex-Immobilisate in Abhängigkeit der Hydrocortison-Induktorkonzentration

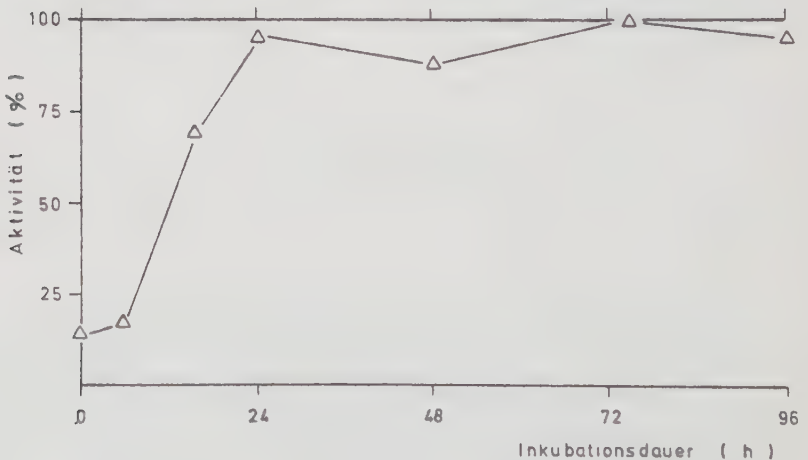


Inkubation mit 100 mg II-co2b-C.simplex-Immobilisat in 24 h in 50 ml Phosphat-Puffer (pH 6,8), 1 % DMF, 30°C, 160 U/min. Aktivitätsbestimmung mit 100 mg Immobilisat in 50 ml Substratlösung, bestehend aus 2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 0,5 mmol l⁻¹ Menadion, 1 % DMF in Phosphat-Puffer (pH 6,8), 30°C, 160 U/min.

Wie aus Abb. 6 hervorgeht, erhöhte sich die enzymatische Aktivität der immobilisierten *C. simplex*-Zellen mit zunehmender Hydrocortison-Induktorkonzentration. Nicht inkubierte Immobilisate zeigten bei den nachfolgenden Steroidtransformationen nur eine vergleichsweise geringe Aktivität. Bei niedrigeren Hydrocortison-Induktorkonzentrationen als $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ wurde während der 24 stündigen Inkubationszeit oft ein vollständiger Abbau des Hydrocortisons beobachtet, so daß die in Abb. 6 dargestellten Induktor-Konzentrationen nur die Anfangskonzentrationen wiedergeben.

In Abb. 7 ist die Aktivität des Immobilisates I-B1/1-*C. simplex* in % der maximalen Aktivität in Abhängigkeit der Inkubationsdauer dargestellt. Die Inkubation erfolgte hier in $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison-Lösungen.

Abb. 7: Aktivität der *C. simplex*-Immobilisate in Abhängigkeit der Inkubationsdauer



Inkubation mit 100 mg I-B1/1-*C. simplex*-Immobilisat in 50 ml $0,5 \text{ mM}$ Hydrocortison in Phosphat-Puffer, 30°C , 160 U/m Aktivitätsbestimmung wie in Abb. 6 angegeben.

Aus Abb. 7 geht hervor, daß nach einer 24 stündigen Inkubationszeit die Induktion der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase in den immobilisierten *C. simplex*-Zellen maximal war. Eine längere Inkubation führte zu keiner weiteren Erhöhung der enzymatischen Aktivität der Immobilisate. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Penasse und Payre (39) berichtet, die die Enzymbiosynthese an freien *C. simplex*-Zellen untersuchten.

Die elementaranalytische Bestimmung des Stickstoff-Gehaltes der Immobilisate vor und nach der Inkubation ergab, daß die Zellkonzentration in den Immobilisaten durch die Inkubation nicht verändert wurde. Es kann daher als gesichert angesehen werden, daß die Aktivitätszunahme der Immobilisate nicht auf einer Vermehrung der Mikroorganismen in den polymeren Netzwerken beruht.

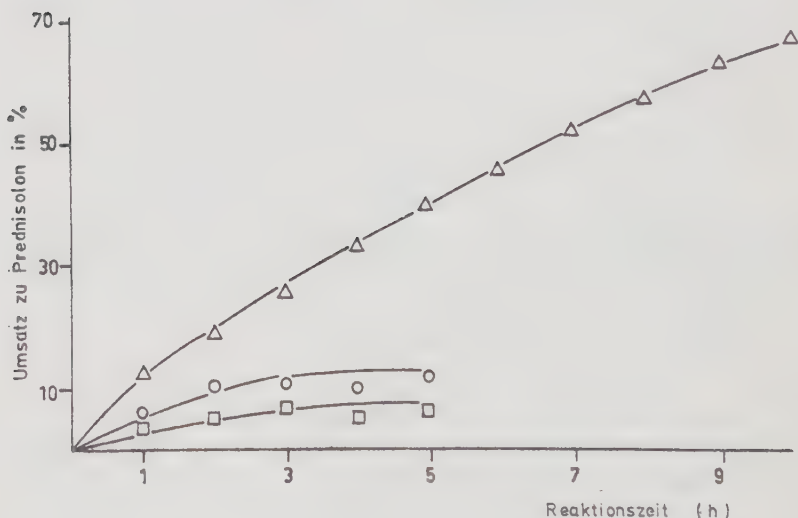
Die Behandlung von Immobilisatproben unter vergleichenden Bedingungen mit Phosphat-Puffer ohne Hydrocortison-Zusatz führte zu keinem Anstieg der Enzymaktivität. Enthielt die Inkubationslösung den bei den Aktivitätsbestimmungen verwendeten Cofaktor Menadion, so wurde die Enzyminduktion nach einem nicht bekannten Mechanismus blockiert und die damit behandelten Immobilisate zeigten keine Aktivitätszunahme bei den Steroidumwandlungen.

Die Enzyminduktion führte dazu, daß die inkubierten *C. simplex*-Immobilisate eine höhere Aktivität bei den Steroidumwandlungen aufwiesen, als das bei den Immobilisierungsreaktionen verwendete *C. simplex*-Trockenpulver. In einer vergleichenden Untersuchung wurde der zeitliche Verlauf der Steroidumwandlung für inkubierte und nicht-inkubierte *C. simplex*-Immobilisate sowie für das freie, nicht inkubierte *Corynebakterium simplex* bestimmt. Die Steroidumwandlungen erfolgten mit jeweils 100 mg Immobilisat bzw. mit der entsprechenden Menge freier *C. simplex*-Zellen unter nicht sterilen Reaktionsbedingungen (Abb. 8 - 10).

Die Substratlösungen enthielten $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison, $0,2$ bis $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion und 1% (v/v) DMF in 50 mM Phosphat-Puffer vom pH 6,8.

Die Steroidumwandlungen erfolgten bei 30°C im offenen Erlenmeyer-Kolben in einem Rotationsschüttler mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 160 U/min .

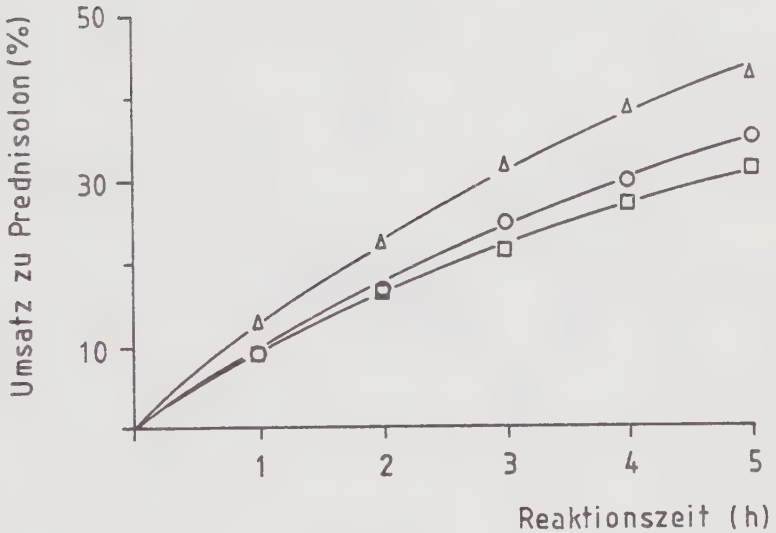
Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon für inkubierte und nicht-inkubierte I-A2/1-C. simplex-Immobilisate sowie für freie C. simplex-Zellen



- I-A2/1-C. simplex-Immobilisat (vor Inkubation)
- △ I-A2/1-C. simplex-Immobilisat (nach Inkubation in $0,2 \text{ mM}$ Hydrocortison, 1% DMF)
- freies C. simplex;

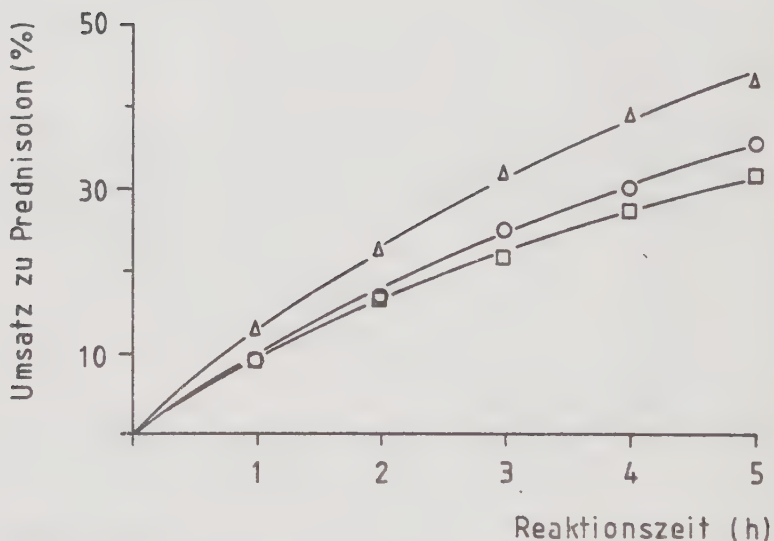
Aktivitätsbestimmung mit 100 mg Immobilisat ($0,5 \text{ g}$ C. simplex/g Immobilisat) bzw. mit 100 mg C. simplex-Trockenpulver in 100 ml Substratlösung, bestehend aus $2,0 \text{ mM}$ Hydrocortison, $0,2 \text{ mM}$ Menadion, 1% DMF

Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon für inkubierte und nicht-inkubierte I-B1/1-C. simplex-Immobilisate sowie für freie C. simplex-Zellen



- I-B1/1-C. simplex-Immobilisat (vor Inkubation)
Δ I-B1/1-C. simplex-Immobilisat (nach Inkubation in 0,5 mM Hydrocortison, 1 % DMF)
○ freies C. simplex;
Aktivitätsbestimmung mit 100 mg Immobilisat (0,79 g C. simplex/g Immobilisat) bzw. mit 79 mg freies C. simplex, Reaktionsbedingungen wie in Abb. 6 angegeben.

Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon für inkubierte IIb-, II-co2b-II-co3b-C. simplex-Immobilisate



- IIb-C. simplex-Immobilisat (0,27 g C. simplex/g Immobil.)
△ II-co2b-C. simplex-Imm. (0,45 g C. simplex/g Immobil.)
○ II-co3b-C. simplex-Imm. (0,48 g C. simplex/g Immobil.)
(jeweils nach Inkubation in 1,0 mM Hydrocortison, 1 % DMF); Aktivitätsbestimmung mit je 100 mg Immobilisat, Reaktionsbedingungen wie in Abb. 6 angegeben.

Umsatz zu Prednisolon jeweils bezogen auf die eingesetzte Menge Hydrocortison.

Die biokatalytischen Aktivitäten der polymerfixierten und der freien Mikroorganismen können durch den Ausdruck der Aktivitätsausbeute quantitativ verglichen werden (99). Die Aktivitätsausbeute (Y) ist ein Maß für die direkt meßbare Bruttoaktivität und ist das prozentuelle Verhältnis der spezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten der immobilisierten ($v_{s,br}$) und der freien Mikroorganismen ($v_{s,frei}$) (Gl. 4):

$$(4) \quad Y = \frac{v_{s,br}}{v_{s,frei}} \cdot 100 \%$$

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v_s von der Zellmasse X und der Substratkonzentration $[S]$ bzw. der Produktkonzentration $[P]$ ist in Gl. 5 dargestellt.

$$(5) \quad v_s = -1/X \cdot d[S] / dt$$

bzw.

$$v_s = 1/X \cdot d[P] / dt$$

wobei $d[P] / dt$ dem Umsatz zu Prednisolon pro Zeiteinheit entspricht.

Die Zellmasse ist die Gesamtmenge der immobilisierten Zellen; es wird hier nicht zwischen den noch enzymatisch aktiven Zellen und den durch die Immobilisierung abgestorbenen Zellen unterschieden.

Aus dem linearen Anfangsbereich der Umsatz-Zeit-Kurven aus Abb. 8 bis Abb. 10 lassen sich die spezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten v_s der immobilisierten und der freien Mikroorganismen und damit die Aktivitätsausbeuten ermitteln (Tab. 6).

Aus den Ergebnissen der Tab. 6 geht hervor, daß eine Enzyminduktion auch bei immobilisierten Mikroorganismen erfolgreich durchgeführt werden kann.

Tab. 6: Spezifische Reaktionsgeschwindigkeiten der freien und immobilisierten C. simplex-Zellen

Immobilisat- Nr.:	a) Reaktions- geschwindigkeit v_s ($\mu\text{mol/g}_{\text{Bakt. h}}$)	Aktivitäts- ausbeute (%)
freies C. simplex	87 - 110	
vor Inkubation:		
I-A2/1-C.simplex	90	82
I-B1/1-C.simplex	33	38
IIb-C.simplex	16,8	15
nach Inkubation:		
I-A2/1-C.simplex	320	291
I-B1/1-C.simplex	213,9	246
IIb-C.simplex	327	297
II-co2b-C.simplex	261,8	238
II-co3b-C.simplex	197,7	180

a) Ermittelt aus dem linearen Anfangsbereich der Umsatz-Zeit-Kurven aus Abb. 8 - 10.

3.14 Eigenschaften der C. simplex-Immobilisate, die die
Diffusion des Substrates beeinflussen
(Zellkonzentration, Partikelgröße)

Die Fixierung von mikrobiellen Zellen in eine polymere Matrix ändert ihre Eigenschaften oft in signifikanter Weise. Es ergeben sich Probleme bei der Diffusion von Substrat, Produkt und Cofaktor sowie des zur Lebensfähigkeit aerober Mikroorganismen und zur Reaktion notwendigen Sauerstoffs durch das polymere Netzwerk. Diese beeinflussen die enzymatische Aktivität der immobilisierten Zellen.

Die heterogene Biotransformationsreaktion mit polymerfixierten Mikroorganismen läßt sich in mehrere aufeinanderfolgende Teilschritte aufgliedern:

- a) Transport des Substrates aus der Lösung zur Oberfläche des Biokatalysators
- b) Diffusion des Substrates durch das polymere Netzwerk zur immobilisierten Zelle
- c) Diffusion des Substrates durch die Zellwand und Zellmembranen des Mikroorganismus an den Ort des spezifisch wirkenden Enzyms
- d) Enzymkatalysierte Reaktion
- e) Transport des Produktes vom reaktiven Zentrum des Enzyms durch die Zellwand und zur äußeren Oberfläche des Biokatalysators (abgekürzt)
- f) Transport des Produktes von der Oberfläche des Biokatalysators in die umgebende Lösung.

Verläuft einer der aufgeführten Reaktionsschritte langsamer als die anderen, so kontrolliert er - wie allgemein bei chemischen Reaktionen - die Reaktionsgeschwindigkeit der Biotransformation.

Zahlreiche in der Literatur beschriebene Untersuchungen bestätigen die Transportbehinderung von Substrat und Produkt zum oder innerhalb eines heterogenen Katalysators (100). Eine ausführliche Zusammenfassung über die Probleme der Diffusion in immobilisierten Enzymsystemen, die in ihrer grundsätzlichen Aussage ebenfalls für immobilisierte Zellen gelten, sowie eine Beschreibung der mathematischen Ableitungen finden sich in der Literatur (101).

Es wurde beschrieben, daß die Diffusion des Substrates in den polymerfixierten Zellen beeinflusst werden kann durch:

- a) die Partikelgröße des Biokatalysators
- b) die Zellkonzentration in der polymeren Matrix
- c) eine gezielte Zerstörung oder Veränderung der Zellwände wie sie durch Hitzebehandlung, spezifische Ionen, oberflächenaktive Substanzen oder organische Lösungsmittel erreicht werden kann.

Während die ersten beiden Punkte eine allgemeine Gültigkeit besitzen, stellt der letzte Punkt nur eine in Ausnahmefällen gültige für Einenzym-Systeme anwendbare Methode dar, da für Multienzym-Reaktionen eine intakte Zelle Voraussetzung ist.

3.11.1 Abhängigkeit der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der C. simplex-Immobilisate von der Zellkonzentration

Die für die Steroidumwandlung optimale Zellkonzentration in den Immobilisaten wurde durch Variation des Gewichtsverhältnisses von Mikroorganismen zu den Polymerisaten ermittelt. Der Zellgehalt in den Immobilisaten ließ sich durch gravimetrische Messung und durch elementaranalytische Bestimmung des Stickstoff-Gehaltes der Immobilisate bestimmen. Die elementaranalytische Zusammensetzung des zur Immobilisierungsreaktion verwendeten C. simplex-Trockenpulvers war wie folgt:

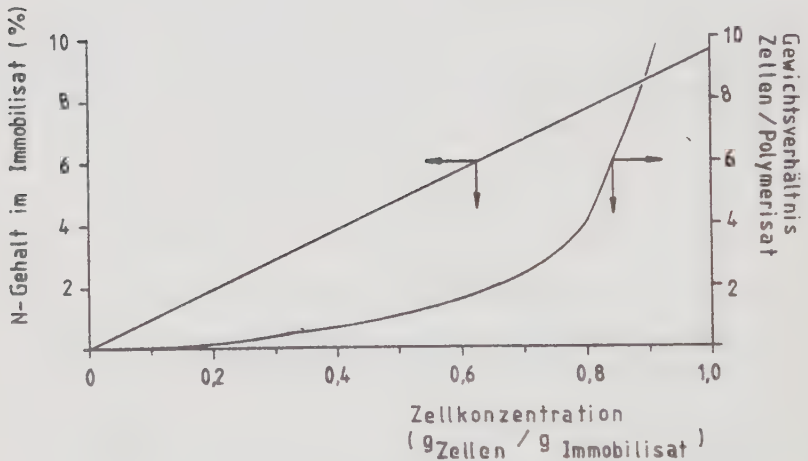
% C: 36,95 % H: 5,62 % N: 9,25

Geringe Schwankungen in der elementaranalytischen Zusammensetzung des C. simplex-Trockenpulvers sind bei verschiedenen Chargen möglich. Sie wurden in den Analysen berücksichtigt.

Für die C. simplex-Immobilisate auf der Basis der stickstofffreien PVA-Derivate ist in Abb. 11 der theoretische Stickstoff-Gehalt der Immobilisate gegen die Zellkonzentration in den Immobilisaten aufgetragen. In derselben Abbildung ist die berechnete Zellkonzentration der Immobilisate in Abhängigkeit vom Gewichtsverhältnis Mikroorganismen/Polymerisat im Immobilisierungsansatz dargestellt.

Durch Vergleich des durch elementaranalytische Bestimmung gefundenen Stickstoff-Gehaltes in den Immobilisaten mit den in Abb. 11 dargestellten Wertepaaren konnte die Zellkonzentration in den Immobilisaten ermittelt werden. Aus dem Vergleich der theoretisch berechneten Zellkonzentration für das bei der Immobilisierungsreaktion vorliegende Gewichtsverhältnis C. simplex/Polymerisat mit der tatsächlichen Zellkonzentration im Immobilisat ließ sich der Anteil der bei der Immobilisierung eingeschlossenen Zellmenge bestimmen.

Abb. 11: Berechneter Stickstoff-Gehalt der PVA-Immobilisate in Abhängigkeit der Zellkonzentration in den Immobilisaten und Abhängigkeit der Zellkonzentration vom Gewichtsverhältnis *C. simplex*/Polymerisat im Immobilisierungsansatz



Die Zellkonzentration in den Immobilisaten wird ausgedrückt in $g_{\text{Zellen}} / g_{\text{Immobilisat}}$.

Bei der Berechnung der Zellkonzentration wurde nicht zwischen enzymatisch aktiven und inaktiven Zellen unterschieden.

In den Tab. 7 - 10 sind die durch Variation des Gewichtsverhältnisses von *C. simplex*-Zellen zum Polymerisat hergestellten Immobilisate mit ihren Zellkonzentrationen und ihren Aktivitäten - ausgedrückt in μmol gebildetes Prednisolon / $g_{\text{Imm. h}}$ bzw. in $\mu\text{mol}/g_{\text{Zellen h}}$ - enthalten.

Tab. 7: Aktivität der I-A2/1-C. simplex-Immobilisate in Abhängigkeit von ihrer Zellkonzentration

Nr.:	Immobilisat- verhältnis C. simplex/ Polymerisat im Immobil.- ansatz	Gewichts- verhältnis C. simplex/ Polymerisat im Immobil.- ansatz	max. mögl. Zellkonz. im Immobil. Immobilisat a) b)	immob. Zellmenge c)	Aktivität d)	Aktivitäts- ausbeute e)	
						($\mu\text{mol/g}_{\text{Imm. h}}$)	($\mu\text{mol/g}_{\text{Zell. h}}$) (%)
I-A2/1-	0,3	0,23	0,17	66,7	0,0	0,0	0
C. simplex	0,6	0,38	0,30	71,7	97,0	323,3	294
	1,2	0,55	0,46	70,8	141,4	307,4	279
	1,5	0,60	0,50	66,7	161,5	323,0	294
	3,1	0,76	0,67	64,5	98,7	147,3	134
	4,7	0,82	0,74	60,6	22,0	29,7	27
	6,2	0,86	0,80	64,5	8,0	10,0	9

a) Berechnet aus dem Gewichtsverhältnis Mikroorganismen/Polymerisat im Immobilisierungsansatz

b) Bestimmt durch gravimetrische Messung

c) In % der bei der Immobilisierung verwendeten Zellmenge

d) Aktivitätsbestimmung in 100 ml Substratlösung, bestehend aus 2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 0,2 mmol l⁻¹ Menadion, 1 % (v/v) DMF in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 6,8), 30°C, 160 U/min mit 100 mg Immobilisat nach Inkubation in 0,2 mmol l⁻¹ Hydrocortison-Lösung

e) Aktivität der freien C. simplex: 110 $\mu\text{mol/g h}$.

Tab. 8: Aktivität der I-B1/1-C. simplex-Immobilisate in Abhängigkeit von ihrer Zellkonzentration

Immobilisat-	Gewichts-	max. mögl.	Zellkonz.	immob.	Aktivität	Aktivitäts-
Nr.:	verhältnis	Zellkonz.	im	Zellmenge	d)	ausbeute
	C. simplex/	im Immobil.	Immobilisat	c)		e)
	Polymerisat	a)	b)			
	im Immobil.-	(g/g)	(g/g)	(%)	($\mu\text{mol/g}_{\text{Imm. h}}$)	($\mu\text{mol/g}_{\text{Zell. h}}$)
	ansatz			(%)		(%)
I-81/1-	1,0	0,50	0,30	86,0	29,1	97,0
C. simplex	2,5	0,71	0,60	60,0	61,8	103,0
	5,0	0,83	0,73	54,1	135,0	184,9
	7,5	0,88	0,79	50,7	169,0	213,9
	9,0	0,90	0,82	51,1	147,2	179,5
	10,5	0,91	0,85	52,0	125,0	147,1

a) Berechnet aus dem Gewichtsverhältnis Mikroorganismen/Polymerisat im Immobilisierungsansatz

b) Berechnet aus dem Stickstoff-Gehalt der Immobilisate

c) In % der bei der Immobilisierung verwendeten Zellmenge

d) Aktivitätsbestimmung in 50 ml Substratlösung, bestehend aus 2,0 mmol l^{-1} Hydrocortison, 0,5 mmol l^{-1} Menadion, 1 % (v/v) DMF in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 6,8), 30°C, 160 U/min mit 100 mg Immobilisat nach Inkubation in 0,5 mmol l^{-1} Hydrocortison-Lösung

e) Aktivität der freien C. simplex: 87 $\mu\text{mol/g h}$.

Tab. 9: Aktivität der IIb-C. simplex-Immobilisate in Abhängigkeit von ihrer Zellkonzentration

Immobilisat-Nr.	Gewichts-verhältnis C. simplex/ Polymerisat im Immobil.-ansatz	max. mögl. Zellkonz. im Immobil. C. simplex/ Polymerisat	Zellkonz. im Immobilisat a) b)	immobil. Zellmenge c)	Aktivität d)	Aktivitäts- ausbeute e)
		(g/g)	(g/g)	(%)	($\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{Imm. h}}$)	($\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{Zell. h}}$) (%)
IIb-	0,5	0,33	0,15	34,0	20,9	139,3
C. simplex	1,0	0,50	0,21	27,0	49,7	236,7
	2,0	0,67	0,27	18,5	88,3	327,0
	3,0	0,75	0,29	13,3	92,8	320,0
	5,0	0,83	0,32	9,2	74,5	232,8
	7,0	0,88	-	instabiles Immobilisatprodukt	-	-

a) Berechnet aus dem Gewichtsverhältnis Mikroorganismen/Polymerisat im Immobilisierungsansatz

b) Ermittelt aus dem Stickstoff-Gehalt der Immobilisate

c) In % der bei der Immobilisierung verwendeten Zellmenge

d) Aktivitätsmessung wie in Tab. 8 angegeben, Inkubation mit $1,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison

e) Aktivität der freien C. simplex: $110 \mu\text{mol/g h}$.

Tab. 10: Aktivität der II-co/b-C. simplex-Immobilisate in Abhängigkeit von ihrer Zellkonzentration

Immobilisat-Nr.	Gewichts- verhältnis C. simplex/ Polymerisat im Immobil.- ansatz	max. mögl. Zellkonz. im Immobil. Immobilisat a)	Zellkonz. im Immobilisat b)	immobil. Zellmenge c)	Aktivität d)	Aktivitäts- ausbeute e)
		(g/g)	(g/g)	(%)	($\mu\text{mol/g}_{\text{Imm. h}}$)	($\mu\text{mol/g}_{\text{Zell. h}}$) (%)
instabiles Immobilisatprodukt						
II-co1b- C. simplex						
II-co2b- C. simplex	1	0,50	0,36	56,0	80,8	224,4 204
	2	0,67	0,45	41,5	117,8	261,8 238
	3	0,75	0,54	39,3	51,2	94,8 86
II-co3b- C. simplex	0,5	0,33	0,20	50,0	17,4	87,0 79
	1	0,50	0,31	45,2	61,0	196,8 179
	2	0,67	0,34	26,0	60,6	178,2 162
	3	0,75	0,48	30,6	94,9	197,7 180
	5	0,83	0,56	25,0	90,0	160,7 146

a) Berechnet aus dem Gewichtsverhältnis Mikroorganismen/Polymerisat im Immobilisierungsansatz

b) Bestimmt durch gravimetrische Messung

c) In % der bei der Immobilisierung verwendeten Zellmenge

d) und e) wie in Tab. 9 angegeben.

Wie aus den in Tab. 7 bis Tab. 10 aufgeführten Ergebnissen über die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der C. simplex-Immobilisate von ihrer Zellkonzentration hervorgeht, zeigten die Polymerisate auf der Basis von Poly-(vinylalkohol) im Vergleich zu den Polymerisaten auf der Basis von Poly-(acrylsäure) deutlich bessere Eigenschaften bei der Einschließung der mikrobiellen Zellen.

Hier zeichneten sich besonders die durch Photoreaktion vernetzten Immobilisate des vinylierten PVA I-B aus. Diese Immobilisate besaßen noch bei einem über 80 proz. Gewichtsanteil an Mikroorganismen mechanisch stabile Eigenschaften.

Wie bereits erwähnt, kann ein geringes Flüssigkeitsvolumen bei den Immobilisierungen für eine vollständige Einschließung der mikrobiellen Zellen vorteilhaft sein.

Der hydrophile Charakter der PVA-Derivate und damit ihre gute Löslichkeit in Wasser ermöglichte bei den Immobilisierungsreaktionen eine höhere Konzentration dieser Polymerisate in wäßriger Lösung.

Während im Falle der PVA-Derivate die Konzentration der Polymerisate im Immobilisierungsansatz 2 % bis 3,5 % betrug, wurde im Falle der Poly-(acrylsäure)-Derivate eine 1 proz. Polymerisatlösung im Immobilisierungsansatz verwendet.

Im Vergleich zu Poly-(acrylsäurehydrazid) IIa besaßen die Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren II-co/a einen hydrophileren Charakter. Dies führte bei den Immobilisierungen unter vergleichenden Reaktionsbedingungen zu höheren Zellkonzentrationen in den mit den Copolymeren hergestellten Immobilisaten.

Der hydrophilere Charakter der Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren im Vergleich zu Poly-(acrylsäurehydrazid) äußerte sich auch in einer stärkeren Quellbarkeit der Copolymeren in wäßriger Lösung. Bei der Quellung der Immobilisate in Phosphat-Puffer (pH 6,8) vergrößerte sich das Eigenvolumen des II-co3b-C. simplex-Immobilisates um das 1,8-fache, das des IIb-C. simplex-Immobilisates dagegen nur um das 1,4-fache

ihres Trockenvolumens.

Unter vergleichenden Untersuchungsbedingungen zeigten die Immobilisate auf der Basis von PVA eine Quellbarkeit um das 2,5-fache ihres Trockenvolumens.

Bei allen mit unterschiedlichen Zellmengen durchgeführten Immobilisierungsreaktionen wurde gefunden, daß die Einschließung der mikrobiellen Zellen besonders bei einer Verwendung von hohen Zellkonzentrationen im Immobilisierungsansatz nur unvollständig erfolgte.

Auch bei niedrigen Zellkonzentrationen im Immobilisierungsansatz wurden die Mikroorganismen nicht vollständig in den polymeren Gelen eingeschlossen.

Hier ist es sehr wahrscheinlich, daß besonders die an der Oberfläche der Immobilisatpartikel nur einseitig eingeschlossenen Zellen bei dem 24 stündigen Waschprozeß aus den Immobilisaten ausgewaschen wurden.

Eine geringe Zellkonzentration in den Immobilisaten führte erwartungsgemäß zu niedrigen Enzymkonzentrationen und dementsprechend zu niedrigen Aktivitäten der Immobilisate bei den Steroidumwandlungen.

Bei hohen Zellkonzentrationen ist für die Zellmasse ein hoher Substratbedarf erforderlich, der infolge der Diffusionshemmung des Substrates in der polymeren Matrix oft nicht gewährleistet ist. Hierauf ist wahrscheinlich die beobachtete Abnahme der Aktivität bei den *C. simplex*-Immobilisaten mit hohen Zellkonzentrationen zurückzuführen. Auch führen hohe Zellkonzentrationen in den Immobilisaten leicht zu mechanisch instabilen Immobilisierungsprodukten.

Die für die Steroidumwandlungen optimalen Zellkonzentrationen der *C. simplex*-Immobilisate wurden von der polymeren Matrix und ihren hydrophilen und diffusionsbeeinflussenden Eigenschaften stark beeinflusst.

Tab. 11 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die zur Steroidtransformation optimalen Zellkonzentrationen in den C. simplex-Immobilisaten.

Tab. 11: Optimale Zellkonzentration der C. simplex-Immobilisate

Immobilisat-	optimale
Nr.:	Zellkonzentration
	$(g_{\text{Zell.}}/g_{\text{Imm.}})$
I-A2/1-C. simplex	0,50
I-B1/1-C. simplex	0,79
IIb-C. simplex	0,27
II-co2b-C. simplex	0,45
II-co3b-C. simplex	0,48

3.11.2 Abhängigkeit der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der C. simplex-Immobilisate von der Partikelgröße

Die Partikelgröße eines Immobilisates beeinflusst wie die Zellkonzentration der Immobilisate ebenfalls aufgrund der erwähnten Diffusionsbehinderungen in den Partikeln die enzymatische Aktivität der immobilisierten Mikroorganismen in starkem Maße.

Im Falle der mit den PVA-Derivaten I-A und I-B als Folien hergestellten Immobilisate war eine Untersuchung über den Einfluß der Foliendicke auf die katalytische Aktivität der Immobilisate nicht möglich. Eine Veränderung der Foliendicke wurde hier eingeschränkt sowohl durch die Art der Vernetzungsreaktion (Diffusion des Luftsauerstoffs zu den reaktiven Thiolgruppen bzw. durch die Lichtdurchlässigkeit des vinylierten PVA) als auch durch die notwendige mechanische Stabilität der Immobilisatfolie.

Der Einfluß der Immobilisat-Partikelgröße auf die Aktivität der immobilisierten C. simplex-Zellen wurde daher mit den Immobilisaten IIb-C. simplex und II-co3b-C. simplex untersucht.

Während bei der mit Poly-(acrylsäurehydrazid) IIb durchgeführten Immobilisierungsreaktion unregelmäßig geformte Immobilisatpartikel mit einem maximalen Korndurchmesser von 0,5 mm entstanden, zeigte das mit dem Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren hergestellte Immobilisat eine weiche Gelstruktur. Diese Immobilisate wurden zur Zerkleinerung durch ein Sieb gepreßt.

Die Immobilisatpartikel wurden mit DIN 4188-Prüfsieben auf dem automatischen Siebgerät Fritsch-Analysette in die einzelnen Kornfraktionen feucht ausgesiebt und nach Inkubation die Aktivität bestimmt. In Tab. 12 ist die Aktivität der einzelnen Kornfraktionen in % der hier maximalen Aktivität zusammengefaßt.

Tab. 12: Einfluß der Immobilisat-Partikelgröße auf die Aktivität der immobilisierten *C. simplex*-Zellen

Immobilisat-Nr.:	Partikelgröße	Aktivität
	(mm)	a) (%)
IIb-	0,5 - 0,2	100
<i>C. simplex</i>	0,2 - 0,1	91,2
	0,1 - 0,05	47,7
II-co3b-	1,0 - 0,8	74,7
<i>C. simplex</i>	0,8 - 0,5	86,7
	0,5 - 0,2	100
	0,2 - 0,1	92,4
	0,1 - 0,05	55,1

a) In % der maximalen Aktivität.

Das Optimum der katalytischen Aktivität zeigten die Immobilisatpartikel mit einem Korndurchmesser von 0,5 - 0,2 mm. Bei den Partikeln mit einem Korndurchmesser über 0,5 mm kann die verringerte Aktivität durch die Diffusionshemmung des Substrates in der polymeren Matrix erklärt werden. Die nicht zu erwartende Abnahme der Aktivität bei kleineren Partikelgrößen als 0,2 mm ist wahrscheinlich auf den Zerkleinerungsprozeß sowie auf die hier relativ größere Oberfläche der Immobilisatpartikel, die eine Zerstörung der oberflächlich fixierten Zellen leichter ermöglicht, zurückzuführen.

Auch über in Poly-(acrylamid) immobilisierten *Achromobacter guttatus*-Zellen wurde berichtet, daß die Immobilisatpartikel bei einer Größe von 5 - 10 mesh (> 2 mm) ihr Aktivitäts-optimum hatten (102). Hingegen wurde von in Epoxydharzen

immobilisierten E. coli-Zellen von einer abnehmenden Aktivität bei zunehmender Partikelgröße berichtet (103).

3.12 Weitere Abhängigkeiten der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten und freien C. simplex-Zellen

Die im nachfolgenden beschriebenen Abhängigkeiten der biokatalytischen Aktivität der polymerfixierten C. simplex-Zellen bei der Steroidumwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon wurden mit den C. simplex-Immobilisaten, durchgeführt, die die in Tab. 11 aufgeführten optimalen Zellkonzentrationen besaßen.

Vor den Steroidumwandlungen wurden alle Immobilisatproben 24 Stunden in Hydrocortison-Lösungen inkubiert.

Die Steroidumwandlungen erfolgten im offenen Erlenmeyerkolben in einem auf 30°C thermostatisierten Rotationsschüttler bei 160 U/min mit 100 mg Immobilisat in 50 ml bzw. 100 ml Substratlösung, die üblicherweise 2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 0,2 bis 0,5 mmol l⁻¹ Menadion und 1 % (v/v) DMF in 50 mM Phosphat-Puffer vom pH 6,8 enthielt.

Eine von dieser Substratlösung abweichende Zusammensetzung ist im Text an entsprechender Stelle oder in den Legenden der Abbildungen angegeben.

Die mit den freien C. simplex-Zellen durchgeführten Untersuchungen erfolgten mit 100 mg bzw. mit der Zellkonzentration der Immobilisate entsprechenden Zellmenge in der angegebenen Substratlösung.

Alle mit den freien und den immobilisierten C. simplex-Zellen durchgeführten Steroidumwandlungen erfolgten unter nicht-sterilen Reaktionsbedingungen.

Die mit den Poly-(vinylalkohol)-Polymerisaten I-C1, I-C2, I-D und I-E hergestellten C. simplex-Immobilisate zeigten bei den Steroidumwandlungen keine enzymatische Aktivität.

Diese Immobilisierungsverfahren führten bei den Mikroorganismen aufgrund der für *C. simplex*-Zellen nicht physiologischen Reaktionsbedingungen bzw. der toxisch wirkenden niedermolekularen Reagenzien zu irreversiblen Schädigungen und zu einem vollständigen Verlust der biokatalytischen Aktivität.

Ihre enzymatische Aktivität behielten die im thiolierten (I-A) und vinylierten (I-B) Poly-(vinylalkohol) sowie in mit Terephthalaldehyd vernetztem Poly-(acrylsäurehydrazid) (IIb) und den entsprechenden Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren (II-co/b) eingeschlossenen *C. simplex*-Zellen. Von diesen Immobilisaten wurden die katalytischen Aktivitäten bei der Steroidumwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon bestimmt und Versuche zur Optimierung durchgeführt.

Die mit den Polymerisaten I-B1, I-B2 und I-B3 hergestellten *C. simplex*-Immobilisate zeigten bei den Aktivitätsbestimmungen nur geringe Unterschiede in ihren katalytischen Eigenschaften. Die weiteren Untersuchungen wurden daher mit dem im gleichen molaren Verhältnis von Hydroxylgruppen des PVA zu Acrylsäure synthetisierten Polymerisat I-B1 durchgeführt.

3.12.1 Abhängigkeit der Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten C. simplex-Zellen von der Rotationsgeschwindigkeit des Inkubationsschüttlers

Der Transport des Substrates aus der Substratlösung zur Oberfläche des Biokatalysators sowie der Transport des Reaktionsproduktes in die umgebende Lösung wird beeinflusst durch die Rühr- oder Schüttelgeschwindigkeit der Reaktionslösung.

Durch eine intensive Durchmischung der Substratlösung werden ständig neue Phasengrenzflächen und Mikroturbulenzen geschaffen. Beide sind Voraussetzung für eine schnelle und vollständige Umsetzung des Substrates in dem Mehrphasen- und Mehrkomponenten-System.

Eine zu starke Rührung erzeugt dagegen Scherkräfte, die zu einer mechanischen Zerstörung der Immobilisate führen können.

Die Durchmischung der Substratlösung sorgt darüberhinaus für die notwendige Belüftung der Reaktionslösung mit Sauerstoff. Der für aerobe Reaktionen notwendige Sauerstoffbedarf hängt vom verwendeten Substrat und von der Art der Umsetzung ab. Nur der in der Flüssigkeit gelöste Sauerstoff nimmt an der mikrobiologischen Reaktion teil.

Die Löslichkeit von Luftsauerstoff in Wasser beträgt bei 30°C

$$c_s = 7,53 \text{ mg l}^{-1} = 0,235 \text{ mmol l}^{-1}$$

und läßt sich für verschiedene Temperaturen aus Gl. 6 berechnen (104):

$$(6) \quad c_s = 14,161 - 0,3943 T + 0,007714 T^2 - 0,0000646 T^3$$

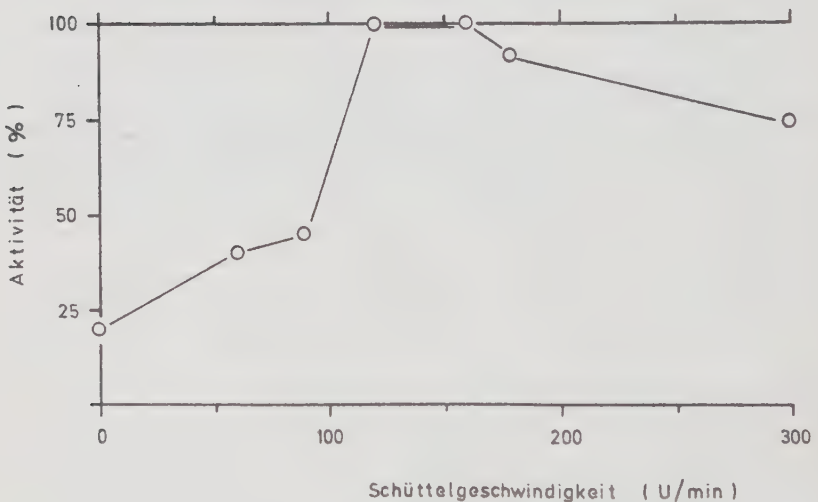
c_s : Luftsauerstoff-Konz.
(mg l^{-1})

T: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)

Neben der Versorgung mit Sauerstoff hat die Belüftung die Aufgabe, gasförmige Stoffwechselprodukte wie CO_2 aus der Reaktionslösung zu entfernen.

Die zur optimalen Steroidumwandlung günstigste Schüttelgeschwindigkeit wurde mit dem Immobilisat I-B1/1-C. simplex mit einem Rotationsschüttler zwischen 0 U/min und 300 U/min untersucht. In Abb. 12 ist die Aktivität des C. simplex-Immobilisates in % der maximalen Aktivität gegen die Rotationsgeschwindigkeit des Schüttlers aufgetragen.

Abb. 12 Abhängigkeit der Aktivität der immobilisierten C. simplex-Zellen von der Schüttelgeschwindigkeit der Reaktionslösung



Aktivitätsbestimmung mit 100 mg I-B1/1-C. simplex-Immobilisat in 50 ml Substratlösung nach den Angaben in Abb. 6.

Wie aus Abb. 12 hervorgeht, liegt die optimale Umdrehungsgeschwindigkeit des Rotationsschüttlers bei 120 - 160 U/min. Wird die Reaktionslösung nicht bewegt, so führt der behinderte Transport des Substrates zur Katalysatoroberfläche sowie die unzureichende Versorgung der immobilisierten Zellen mit Luftsauerstoff zu niedrigeren Aktivitäten.

Bei Umdrehungsgeschwindigkeiten über 160 U/min kommt es zu einem geringen Abfall der enzymatischen Aktivität, vielleicht aufgrund einer Zerstörung der an der Oberfläche der Partikeln fixierten Zellen.

In einer weitergehenden Untersuchung wurde gefunden, daß die Belüftung der Reaktionslösung mit reinem Sauerstoff zu einer verminderten enzymatischen Stabilität führen kann. Bei gleicher Anfangsaktivität der immobilisierten *C. simplex*-Zellen zeigte eine mit reinem Sauerstoff belüftete Immobilisatprobe im Vergleich zu den mit Luftsauerstoff belüfteten Immobilisaten nach 24 stündiger Reaktion einen um etwa 40 % geringeren Umsatz zu Prednisolon.

Wurden die Reaktionslösungen unter Ausschluß von Luftsauerstoff mit Stickstoff belüftet, so zeigten die immobilisierten Mikroorganismen, wie es für Aerobier zu erwarten war, keine Aktivität mehr.

Die Untersuchungen ließen erkennen, daß eine nicht ausreichende Belüftung der Substratlösung die Reaktionsgeschwindigkeit erwartungsgemäß limitiert.

3.12.2 Abhängigkeit der Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität von der Substrat-Konzentration

Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der C. simplex-Immobilisate von der Substrat-Konzentration wurde in Substratlösungen mit $0,2 \text{ mmol l}^{-1}$ bis $5,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison untersucht.

In Hydrocortison-Lösungen, die höher als $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ konzentriert waren, fiel ein Teil des Hydrocortisons aus und lag dann auch als Bodenkörper vor.

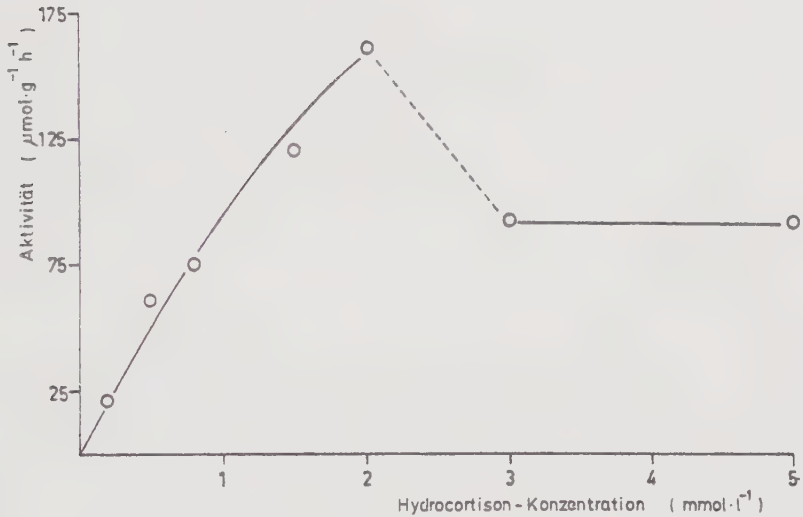
Alle Steroidumsetzungen wurden mit gleichbleibender Menadion-Konzentration ($0,2 \text{ mmol l}^{-1}$ bzw. $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$) und gleichbleibender DMF-Konzentration (1 %) durchgeführt.

Die Aktivitäten der C. simplex-Immobilisate sind in den Abb. 13 -15 und im Vergleich dazu die Aktivität der freien C. simplex-Zellen in Abb. 16 gegen die Hydrocortison-Konzentration aufgetragen.

Mit zunehmender Substrat-Konzentration erhöhte sich anfänglich die Aktivität der immobilisierten sowie der freien C. simplex-Zellen. Die Aktivität verringerte sich bei höheren Hydrocortison-Konzentrationen als $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$, da ein Teil des Hydrocortisons, wie oben angegeben, nach kurzer Zeit als Festkörper ausfiel.

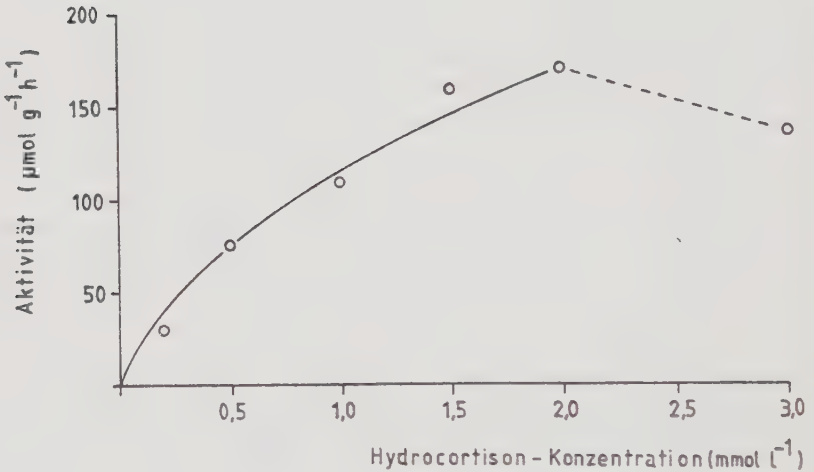
Aus einer $2,0 \text{ mM}$ Hydrocortison-Lösung der oben beschriebenen Zusammensetzung wurden nach 24 stündiger Steroidumsetzung bei vollständigem Hydrocortison-Abbau maximal 90 bis 95 % Prednisolon erhalten. Die unvollständige Umwandlung des Hydrocortisons zu Prednisolon bei vollständigem Abbau des Hydrocortisons läßt sich durch einen Abbau der Steroide im allgemeinen Stoffwechsel der Zellen erklären (105).

Abb. 13: Einfluß der Hydrocortison-Konzentration auf die Aktivität des Immobilisates I-A2/1-C. simplex



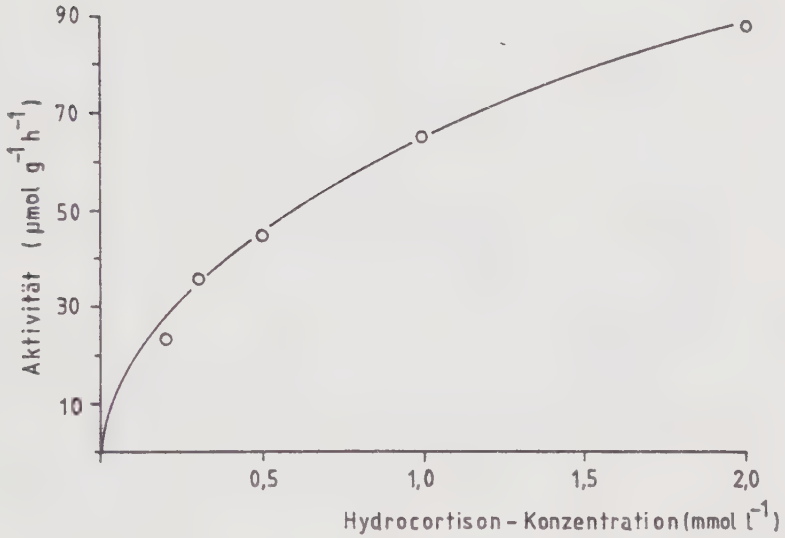
Aktivitätsmessung mit 100 mg Immobilisat I-A2/1-C. simplex in 100 ml Substratlösung mit 0,2 mmol l⁻¹ Menadion, 1 % DMF in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 6,8) nach Inkubation in 0,2 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 30°C, 160 U/min.

Abb. 14: Einfluß der Hydrocortison-Konzentration auf die Aktivität des Immobilisates I-B1/1-C. simplex



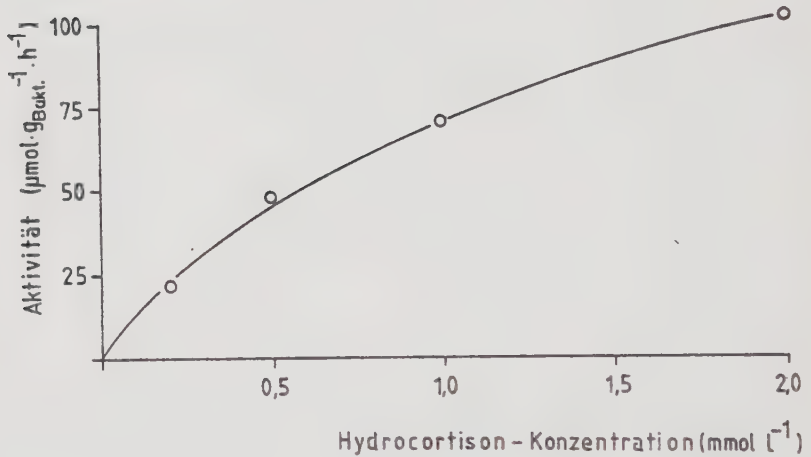
Aktivitätsbestimmung mit 100 mg Immobilisat I-B1/1-C. simplex in 50 ml Substratlösung mit 0,5 mmol l⁻¹ Menadion, 1 % DMF in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 6,8) nach Inkubation in 0,5 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 30°C, 160 U/min.

Abb. 15: Einfluß der Hydrocortison-Konzentration auf die Aktivität des Immobilisates I Ib-C. simplex



Aktivitätsbestimmung mit 100 mg I Ib-C. simplex-Immobilisat (Korngröße: 0,5 - 0,2 mm) in 50 ml Substratlösung mit 0,5 mmol l⁻¹ Menadion, 1 % DMF in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 6,8) nach Inkubation in 1,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison.

Abb. 16: Einfluß der Hydrocortison-Konzentration auf die Aktivität der freien C. simplex-Zellen



Aktivitätsbestimmung mit 100 mg freier C. simplex-Zellen in 50 ml Substratlösung mit 0,5 mmol l⁻¹ Menadion, 1 % DMF in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 6,8), ohne Inkubation.

Das kinetische Verhalten enzymkatalysierter Reaktionen wird durch die aus der Michaelis-Menten- bzw. Lineweaver-Burk-Darstellung ermittelten K_M -Werte und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max}$ charakterisiert (106). Definitionsgemäß ist der K_M -Wert gleich derjenigen Substratkonzentration, bei welcher die enzymatische Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft.

Die Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 7) gilt als kinetischer Ausdruck für Reaktionsordnungen zwischen 0. und 1. Ordnung nur für Enzymreaktionen in homogener Lösung. Die in den freien und immobilisierten Zellen die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussenden Diffusionsvorgänge sowie andere Faktoren erlauben nur die Bestimmung eines scheinbaren K_M -Wertes ($K_{M \text{ app}}$) und einer scheinbaren maximalen Reaktionsgeschwindigkeit. Diese empirischen Parameter dienen oft zur Charakterisierung des kinetischen Verhaltens von immobilisierten Enzymen und immobilisierten ganzen mikrobiellen Zellen.

$$(7) \quad - \frac{d[S]}{dt} = \frac{k \cdot ES}{K_M + S}$$

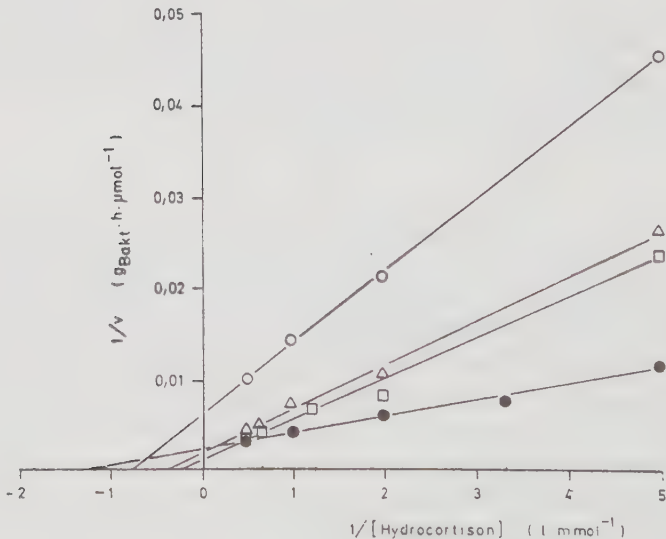
Zur Bestimmung des K_M (app)-Wertes und der scheinbaren maximalen Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max}$ wurde nach der Lineweaver-Burk-Gleichung (Gl. 8) in doppelt reziproker Auftragung die Aktivität der *C. simplex*-Immobilisate gegen die Hydrocortison-Konzentration im Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt (Abb. 17). Der Kurvenverlauf stellt im Idealfall eine Gerade dar, welche die Abszisse im Punkt $-1/K_{M(\text{app})}$ schneidet und deren Steigung $K_{M(\text{app})}/v$ ist.

$$(8) \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{S}$$

Im Konzentrationsbereich von $0,2 \text{ mmol l}^{-1}$ bis $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison lagen die in doppelt reziproker Darstellung aufgetragenen Werte der Substratkonzentration und der Aktivitäten auf einer Geraden.

In der Lineweaver-Burk-Darstellung wurden die Werte für die höher als $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ konzentrierten Hydrocortison-Lösungen nicht berücksichtigt, da hier die niedrigeren Aktivitäten durch eine Phasenänderung zu erklären sind.

Abb. 17: Lineweaver-Burk-Darstellung für immobilisierte und freie C. simplex-Zellen



- $\circ$ freies C. simplex; $\square$ I-A2/1-C. simplex;
 Δ I-B1/1-C. simplex; $\bullet$ IIb-C. simplex.

Die aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm durch lineare Regression ermittelten $K_{M(app)}$ -Werte und die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten v_{max} der C. simplex-Immobilisate sowie der freien C. simplex-Zellen sind in Tab. 13 zusammengefaßt.

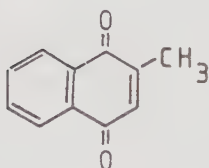
Tab. 13: Zusammenfassung der $K_{M(app)}$ - und v_{max} -Werte der freien und immobilisierten C. simplex-Zellen

Immobilisat- Nr.:	$K_{M(app)}$ -Wert (mmol l ⁻¹)	v_{max}	
		(μ mol/g _{Imm.} h)	(μ mol/g _{Zell.} h)
I-A2/1- C. simplex	4,40	492,6	985,2
I-B1/1- C. simplex	2,54	417,8	528,9
IIb- C. simplex	0,83	123,7	458,2
freies C. simplex	1,32	-	168,1

Der im Vergleich zu den freien C. simplex-Zellen höhere $K_{M(app)}$ -Wert der immobilisierten Zellen ist auf die eingeschränkte Diffusion des Substrates in der polymeren Matrix sowie auf die höhere Enzymkonzentration der inkubierten Immobilisate zurückzuführen. Die Enzyminduktion ist der Grund für die höheren Werte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der immobilisierten C. simplex-Zellen im Vergleich zu den freien, nicht inkubierten Zellen.

3.12.3 Abhängigkeit der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten und freien C. simplex-Zellen von der Menadion-Konzentration

Der Elektronenakzeptor Menadion (Vitamin K_3) wird oft bei der Biotransformation von Hydrocortison zu Prednisolon als Cofaktor verwendet (47). Durch die elektronenübertragenden Eigenschaften des Cofaktors wird das durch das Steroid reduzierte Enzym re-oxidiert. Nach seiner enzymatischen Reduktion wird Menadion durch Oxidation mit atmosphärischem Luftsauerstoff in seine chinoid Form überführt und kann dann erneut wirksam werden.

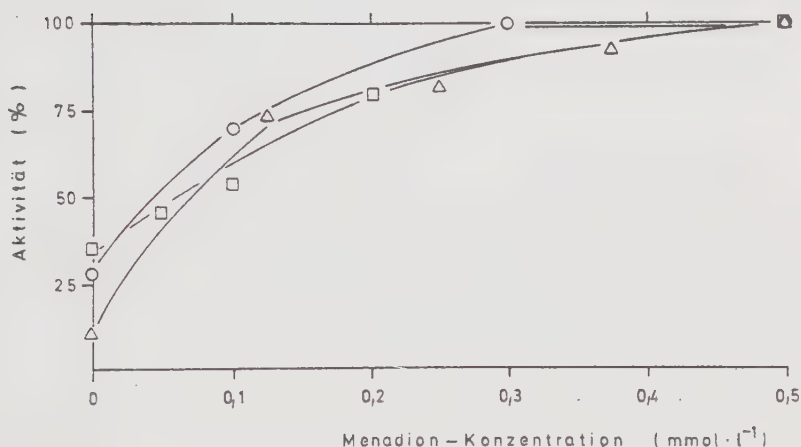


Menadion
(Vitamin K_3)

Dem Reaktionsschema entsprechend wären bei den Steroidumwandlungen nur katalytische Menadion-Konzentrationen notwendig. Die Untersuchungen ergaben jedoch, daß die Aktivität der C. simplex-Immobilisate mit der Menadion-Konzentration zunahm. Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der immobilisierten und der freien C. simplex-Zellen ist in % der maximalen Aktivität in Abb. 18 dargestellt. Die Steroidumwandlungen erfolgten mit 100 mg C. simplex-Immobilisat bzw. mit 100 mg freien C. simplex-Zellen in $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison-Lösungen. Für die immobilisierten

C. simplex-Zellen lag die optimale Menadion-Konzentration bei $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$. Bei den freien C. simplex-Zellen wurde bereits bei einer Menadion-Konzentration von $0,3 \text{ mmol l}^{-1}$ die maximale Aktivität erreicht.

Abb. 18: Einfluß der Menadion-Konzentration auf die Aktivität der immobilisierten und freien C. simplex-Zellen



- I-A2/1-C. simplex-Immobilisat;
- △ I-B1/1-C. simplex-Immobilisat;
- freies C. simplex.

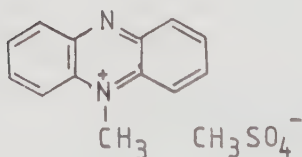
Aktivitätsbestimmung mit 100 mg C. simplex-Immobilisat in 100 ml bzw. 50 ml Substratlösung, bestehend aus $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison, 1 % DMF in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 6,8) bei 30°C und 160 U/min bzw. mit 100 mg freien C. simplex-Zellen.

Auch in Abwesenheit des Menadions fand eine Dehydrierung des Hydrocortisons zu Prednisolon statt. Die hier gefundenen Aktivitäten betrug jedoch nur 10 - 37 % der mit Menadion maximal erreichbaren Aktivität. Die Re-oxidation der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase wird in diesem Falle von zelleigenen Elektronenakzeptoren übernommen (siehe 3:3).

Bei höheren Menadion-Konzentrationen als 0,5 mmol l⁻¹ fiel bei der in der Substratlösung vorhandenen DMF-Konzentration (1 %) festes Menadion aus. Dies führte dann zu niedrigeren Aktivitäten.

Die zu einer optimalen Steroidumwandlung notwendige höhere Menadion-Konzentration bei den polymerfixierten C. simplex-Zellen ist auf die Diffusionshemmung des Cofaktors innerhalb der polymeren Matrix und der verminderten Sauerstoff-Diffusion zurückzuführen. Jedoch ist der Unterschied des Konzentrations-einflusses des Cofaktors auf die enzymatische Aktivität der freien und immobilisierten C. simplex-Zellen vergleichsweise gering.

Die Funktion des elektronenübertragenden Cofaktors kann u.a. auch von N-Methylphenazonium-methosulfat übernommen werden (39). N-Methylphenazonium-methosulfat erreichte jedoch beim Immobilisat I-B1/1-C. simplex nur 70 % der Wirksamkeit des Menadions.



N-Methylphenazonium -
methosulfat

3.12.4 Abhängigkeit der Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten und freien C. simplex-Zellen von der Reaktionstemperatur

Die Geschwindigkeit von Enzymreaktionen nimmt - wie allgemein bei chemischen Reaktionen - mit der Reaktionstemperatur zu. Die Geschwindigkeitszunahme beschränkt sich bei enzymkatalysierten Reaktionen nur auf einen kleinen Temperaturbereich, da sich die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur wieder vermindert. Die Enzyme als thermolabile Proteine zeigen ein enges Temperaturoptimum, das durch eine Überlagerung zwischen der mit der Temperatur steigenden Aktivität und der gleichzeitigen thermischen Inaktivierung des Enzyms erklärt werden kann.

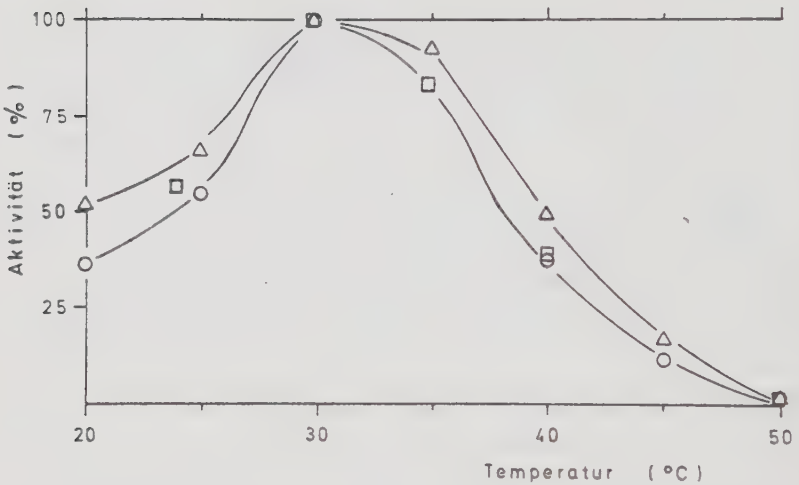
Der Einfluß der Reaktionstemperatur auf die Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der freien und immobilisierten C. simplex-Zellen wurde im Temperaturbereich von 20°C bis 50°C in 5°C-Intervallen in 2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison-Lösungen untersucht.

In Abb. 19 ist der Einfluß der Reaktionstemperatur auf die Anfangsaktivität in % der bei 30°C gefundenen maximalen Aktivität dargestellt.

Das Temperaturoptimum der Steroidumwandlung lag für die immobilisierten ebenfalls wie für die freien C. simplex-Zellen bei 30°C. Bei 50°C verloren die C. simplex-Immobilisate ebenso wie die freien C. simplex-Zellen vollständig ihre biokatalytische Aktivität.

Wie nähere Untersuchungen zeigten, führte die Temperaturbelastung zu einem irreversiblen Verlust der enzymatischen Aktivität.

Abb. 19: Temperaturabhängigkeit der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der freien und immobilisierten C. simplex-Zellen



- I-A2/1-C. simplex-Immobilisat;
- △ I-B1/1-C. simplex-Immobilisat;
- freies C. simplex.

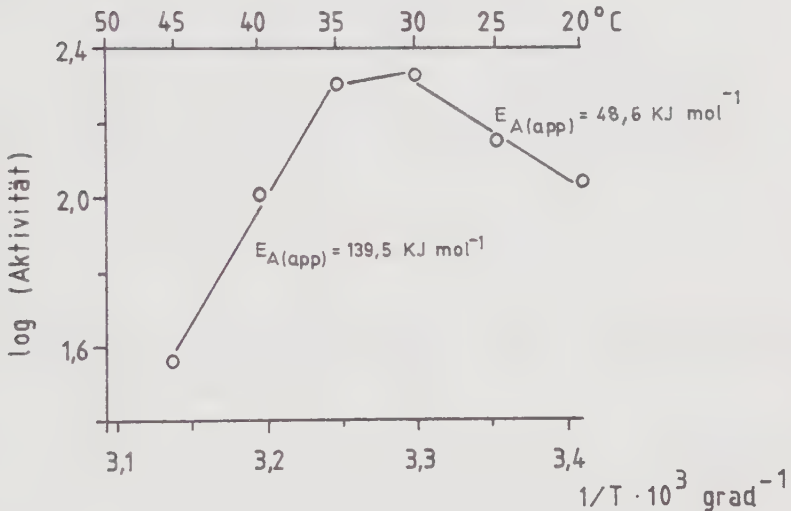
Aktivitätsbestimmung wie in Abb. 6 angegeben.

Aus der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Reaktionstemperatur läßt sich mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung (Gl. 9) die Aktivierungsenergie E_A bzw. in heterogenen Reaktionssystemen die scheinbare Aktivierungsenergie $E_{A(app)}$ der enzymkatalysierten Reaktion ermitteln.

$$(9) \quad \ln k = - \frac{E_A}{RT} + \text{const.}$$

Aus der graphischen Auftragung $\log (\text{Aktivität}) = f(1/T)$ ergeben sich Geraden mit der Steigung $-E_A/2,303 R$ (Abb. 20).

Abb. 20: Arrhenius-Darstellung für immobilisierte C. simplex-Zellen



Für die enzymkatalysierte Reaktion der Steroidtransformation betrug die Aktivierungsenergie $E_{A(app)} 48,6 \text{ KJ mol}^{-1}$. Die thermische Denaturierung der Steroid- $\Delta 1$ -Dehydrogenase führte bei Temperaturen über 35°C in der Auftragung $\log (\text{Aktivität}) = f(1/T)$ zu einer Geraden mit negativer Steigung, aus der sich die Desaktivierungsenergie der Enzymreaktion mit $139,5 \text{ KJ mol}^{-1}$ errechnen ließ.

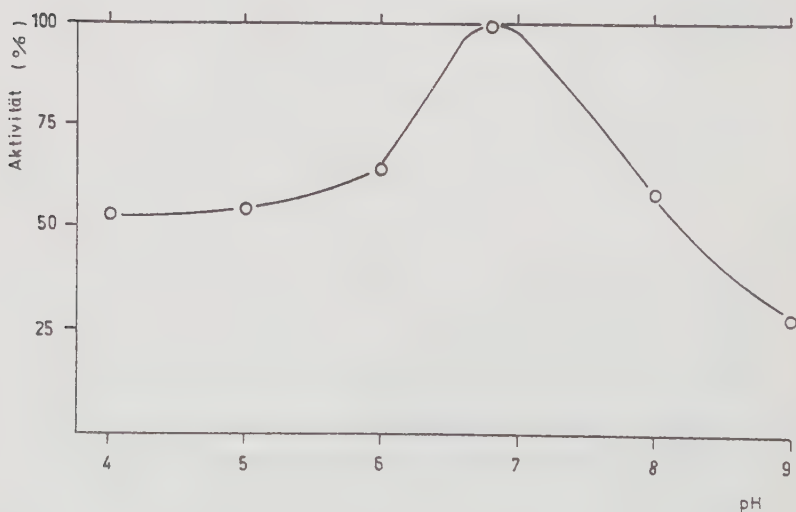
Es ist bekannt, daß zu der relativ niedrigen Aktivierungsenergie im Gegensatz die hohe Desaktivierungsenergie der Enzymreaktion steht (107). Dies liegt jedoch nicht in der thermischen Stabilität der Enzyme, sondern in der durch die Denaturierung von Proteinen erfolgenden Entropiezunahme begründet.

3.12.5 Abhängigkeit der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität
der immobilisierten C. simplex-Zellen vom pH-Wert
der Substratlösung

Der Einfluß des pH-Wertes der Substratlösung auf die Aktivität der C. simplex-Immobilisate wurde im Bereich von pH 4 bis pH 9 untersucht. Die Steroidumsetzungen erfolgten in Phosphat-Lösungen, die auf den angezeigten pH-Wert eingestellt waren.

Die gefundenen Aktivitäten sind in % der maximalen Aktivität gegen den pH-Wert der Substratlösung in Abb. 21 aufgetragen.

Abb. 21: pH-Aktivitätsprofil der C. simplex-Immobilisate



Messung mit 100 mg I-A2/1-C. simplex-Immobilisat;
Aktivitätsbestimmung wie in Abb. 8 angegeben.

Wie es für *C. simplex*-Zellen zu erwarten war, lag das pH-Optimum der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität um den Neutralpunkt. Der pH-Wert der Substratlösung hat auf die Aktivität der *C. simplex*-Immobilisate großen Einfluß. Bereits eine geringe pH-Verschiebung bewirkt eine Verringerung der enzymatischen Aktivität. Bei niedrigen pH-Werten bleibt die Aktivität der Immobilisate besser erhalten.

3.13 Einfluß organischer Lösungsmittel auf die
Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten
C. simplex-Zellen

Enzymkatalysierte Reaktionen werden hauptsächlich in wäßrigen Lösungen durchgeführt. Die Löslichkeit zahlreicher Steroidverbindungen in Wasser ist jedoch gering und beträgt mit wenigen Ausnahmen nur 10^{-5} mol l⁻¹ bis 10^{-4} mol l⁻¹. Ist es für die Biotransformation notwendig, daß das Steroid in gelöster Form vorliegt, sind in wäßriger Lösung große Volumina bei den Reaktionsansätzen sowie konsequenterweise hohe Biokatalysator-Mengen notwendig.

Die denaturierende Wirkung organischer Lösungsmittel auf Enzymsysteme bzw. ihre destabilisierende Wirkung auf ganze mikrobielle Zellen verhinderte bisher ihre breite Anwendung bei den enzymkatalysierten Reaktionen. Es wurden daher nur wenige Untersuchungen über Substratumsetzungen durch immobilisierte Mikroorganismen in organischen Lösungsmitteln publiziert (108 - 110).

Besonders mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel wirken in hoher Konzentration oder nach längerer Einwirkung auf das Enzym bzw. auf die Mikroorganismen denaturierend und inhibieren möglicherweise durch kompetitive Hemmung die enzymatische Reaktion (111). In geringer Konzentration dagegen kann das organische Lösungsmittel, wie es die folgenden Untersuchungen zeigten, die katalytische Aktivität der Mikroorganismen erhöhen.

Im Vergleich zu wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln sind bei wasserunlöslichen organischen Lösungsmitteln geringere denaturierende und inhibierende Einflüsse auf die Enzymsysteme zu erwarten. In dem aus einer wäßrigen und einer organischen Phase bestehenden Zwei-Phasen-System ist der Biokatalysator in der wäßrigen Phase und das hydrophobe Substrat in der organischen Phase lokalisiert.

Die Konzentration des organischen Lösungsmittels ist hier in der wäßrigen Phase gering und wird, selbst bei einer hohen Volumenkonzentration des organischen Lösungsmittels nicht vom Verhältnis der beiden Phasen bestimmt. Die durch die Sättigungskonzentration begrenzte Löslichkeit des organischen Lösungsmittels in der wäßrigen Phase läßt auch geringere toxische Einflüsse auf die Enzymsysteme erwarten.

Bei Zwei-Phasen-Systemen komplizieren sich die in 3.10 erwähnten Reaktionsschritte der heterogenen Katalyse, da das Substrat in einem der eigentlichen Reaktion zusätzlich vorgelagerten Reaktionsschritt erst in diejenige Phase überführt werden muß, in der die Enzymreaktion stattfindet. Die enzymkatalysierte Reaktion findet hauptsächlich in der wäßrigen Phase statt, da die Reaktionsgeschwindigkeit nur von der in der wäßrigen Phase vorhandenen Substratkonzentration abhängt und nicht von der im Zwei-Phasen-System vorliegenden Gesamtkonzentration des Substrates bestimmt wird (109). Die Effektivität der organischen Lösungsmittel bei den Biotransformationsreaktionen wird beeinflußt von den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Lösungsmittels, wie Dichte, Siedepunkt, Oberflächenspannung sowie der Sauerstoff- und vor allem der Wasserlöslichkeit (108).

Die Behandlung der Mikroorganismen mit organischen Lösungsmitteln kann eine gezielte Methode sein, die Durchlässigkeit der Zellwand und der Zellmembranen für Substrat und Produkt zu erhöhen. Zum gezielten Abbau von Permeabilitätsbarrieren in den Zellwänden werden die Zellen oft mit Toluol behandelt. Ein weiterer Grund der Behandlung von Zellen mit organischen Lösungsmitteln kann in der gezielten Inhibierung von Enzymreaktionen, die als Folge- oder Nebenreaktionen zu unerwünschten Produkten führen, gesehen werden.

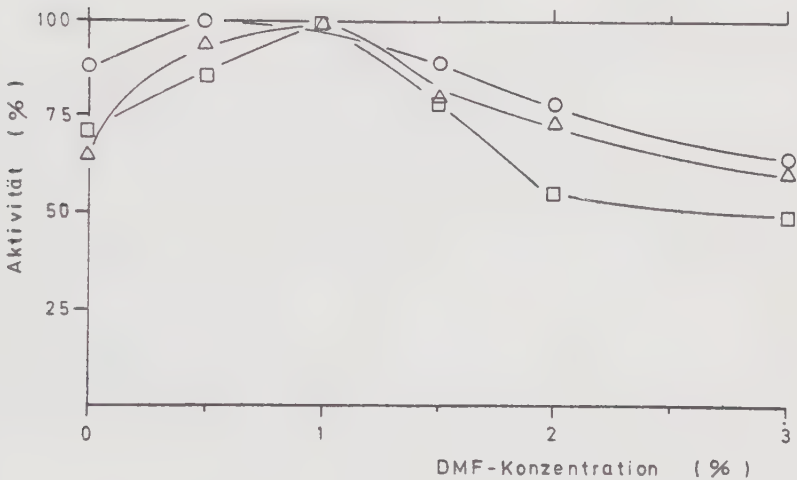
In der Regel werden sich destabilisierende Einflüsse auf das gesamte zelluläre Enzymsystem durch organische Lösungsmittel nicht vermeiden lassen. Das Ziel der im

nachfolgenden aufgeführten Untersuchungen war es daher, organische Lösungsmittel mit geringen zellschädigenden Wirkungen, die gleichzeitig eine gute Löslichkeit für das umzusetzende Hydrocortison zeigten, zu finden.

N,N-Dimethylformamid (DMF) zeigte für Hydrocortison besonders gute Lösungseigenschaften. Wie erwähnt, erhöht das DMF in der Substratlösung zwar die Löslichkeit des Substrates sowie des Cofaktors, jedoch kann gleichzeitig eine Schädigung der Mikroorganismen durch das organische Lösungsmittel hervorgerufen werden. Die Untersuchungen über den Einfluß organischer Lösungsmittel auf die Aktivität der immobilisierten *C. simplex*-Zellen erfolgte mit den Immobilisaten I-A2/1-*C. simplex* und I-B1/1-*C. simplex*. In den Substratlösungen (2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 0,2 bis 0,5 mmol l⁻¹ Menadion) wurde die DMF-Konzentration im Bereich von 0 % bis 3 % (v/v) variiert. Die Aktivitäten sind in % der in dieser Untersuchung ermittelten maximalen Aktivität gegen die DMF-Konzentration der Substratlösung in Abb. 22 aufgetragen.

Bei den Substratlösungen ohne DMF-Anteil lagen Hydrocortison und Menadion in feinverteilter Form in der Substratlösung fest vor. Das nur gering wasserlösliche Hydrocortison wurde dennoch von den immobilisierten *C. simplex*-Zellen mit 65 % bis 71 % der in der 1 % DMF-haltigen Substratlösung vorgefundenen maximalen Aktivität zu Prednisolon umgewandelt. Von den freien *C. simplex*-Zellen wurde in der DMF-freien Substratlösung das Hydrocortison mit 87 % der in der 1 proz. DMF-Lösung maximalen Aktivität zu Prednisolon umgesetzt. Das Optimum der DMF-Konzentration lag für die immobilisierten *C. simplex*-Zellen bei 1 % DMF-Anteil in der Substratlösung. Bei höheren DMF-Konzentrationen als 1 % wurde vermutlich aufgrund einer Schädigung der Mikroorganismen ein Aktivitätsabfall festgestellt. Für die freien *C. simplex*-Zellen lag die optimale DMF-Konzentration bei 0,5 % (v/v).

Abb. 22: Einfluß der DMF-Konzentration auf die Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten und freien C. simplex-Zellen



□ I-A2/1-C. simplex-Immobilisat;

△ I-B1/1-C. simplex-Immobilisat;

○ freies C. simplex.

Aktivitätsbestimmung wie in Abb. 6 angegeben.

Einige andere organische Lösungsmittel besaßen zwar eine geringere Löslichkeit für Hydrocortison, zeigten jedoch zum Teil geringere toxische Nebenwirkungen bei den immobilisierten C. simplex-Zellen. Die Untersuchungen wurden sowohl mit wasserlöslichen als auch mit wasserunlöslichen organischen Lösungsmitteln, im letzteren Fall in einem Zwei-Phasen-System, durchgeführt. Den Substratlösungen ($2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison, $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion in Phosphat-Puffer) wurden 10 % (v/v) des entsprechenden

Lösungsmittels zugesetzt. Wegen der geringeren Löslichkeit des Hydrocortisons in den organischen Lösungsmitteln wurde den Substratlösungen außerdem noch DMF zugegeben (DMF-Konzentration: 0,2 % (v/v)).

Der Umsatz zu Prednisolon nach 24 stündiger Steroidumwandlung ist in Tab. 14 für die verschiedenen Substratlösungen dargestellt.

Tab. 14: Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon mit dem I-B1/1-C. simplex-Immobilisat in organischen Lösungsmitteln

			Umsatz zu Prednisolon nach 24 h (%) (bezogen auf d. einges. Hydrocortison-Menge)
wasserlösliche Lösungsmittel:			
Substratlösung	0,2 % DMF		69,8
enthält:	+ 10 % DMF		8,1
	+ 10 % Methanol		52,2
	+ 10 % Propanol		0
	+ 10 % Dioxan		10,6
wasserunlösliche Lösungsmittel:			
Substratlösung	0,2 % DMF		69,8
enthält:	+ 10 % n-Hexan		58,1
	+ 10 % Chloroform		16,4
	+ 10 % Essigsäure- ethylester		2,3
	+ 10 % Toluol		12,0

Messung mit 100 mg I-B1/1-C. simplex-Immobilisat in 50 ml Substratlösung (2,0 mM Hydrocortison, 0,5 mM Menadion, 0,2 % DMF und 10 % (v/v) organisches Lösungsmittel), 30°C, 160 U/min.

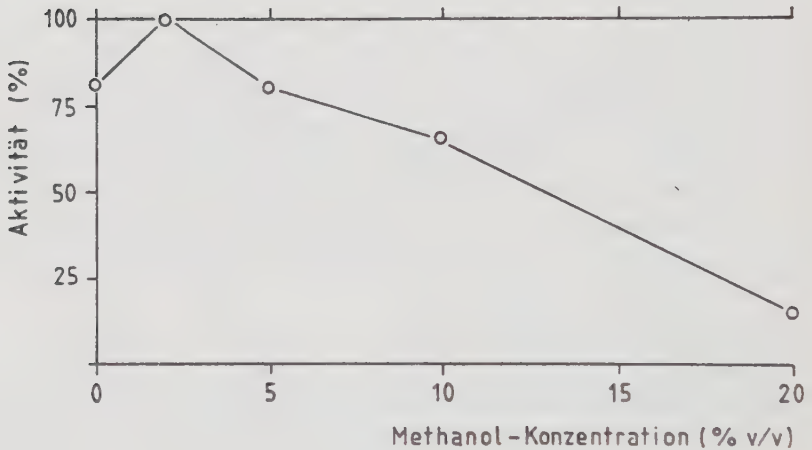
Methanol besaß als mit Wasser vollständig mischbares organisches Lösungsmittel zwar eine geringere Löslichkeit für Hydrocortison, zeigte jedoch bei dem Immobilisat I-B1/1-C. simplex wesentlich geringere toxische Nebenwirkungen als eine DMF-haltige Substratlösung in entsprechender Konzentration.

In einer weiteren Untersuchung wurde die Methanol-Konzentration in den Substratlösungen, denen zusätzlich 1 % DMF wegen der geringeren Löslichkeit des Hydrocortisons in den methanolischen Lösungen zugesetzt wurde, im Bereich von 0 % bis 20 % variiert. Es wurde gefunden, daß ähnlich wie im Falle der DMF-haltigen Substratlösung auch hier die Aktivität der immobilisierten C. simplex-Zellen mit zunehmender Methanol-Konzentration abnahm. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 23 dargestellt.

Von den untersuchten wasserunlöslichen Lösungsmitteln zeigte n-Hexan die geringsten toxischen Eigenschaften. Die geringe Löslichkeit des Hydrocortisons in n-Hexan ließ dieses Lösungsmittel jedoch für die Substratumsetzungen als wenig geeignet erscheinen.

Steroidumsetzungen mit dem Immobilisat I-B1/1-C. simplex in organischen Lösungsmitteln ohne Zugabe von wäßrigen Pufferlösungen führten in allen Fällen zur vollständigen Inaktivierung der Immobilisate.

Abb. 23: Abhängigkeit der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten C. simplex-Zellen von der Methanol-Konzentration in der Substratlösung



Aktivitätsmessung mit 100 mg I-B1/1-C. simplex-Immobilisat in 50 ml Substratlösung, bestehend aus $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison, $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion, 1 % DMF und Methanol in Phosphat-Puffer, 30°C , 160 U/min.

3.14 Bestimmung der Halbwertszeit der C. simplex-
Immobilisate und pseudokristalline Fermentation

Ein wichtiges Ziel der Polymerfixierung von ganzen mikrobiellen Zellen ist es, durch die Vergrößerung der geometrischen Dimensionen des Biokatalysators ihre Wiedergewinnung aus den Reaktionslösungen zu gewährleisten und damit ihre Wiederverwendung in neuen Reaktionsansätzen zu ermöglichen. Ein wiederholter Einsatz der immobilisierten Mikroorganismen erscheint dann wirtschaftlich, wenn die biokatalytische Aktivität der Immobilisate über mehrere Umsetzungen möglichst unverändert hoch bleibt.

Durch ein Wachstum der Mikroorganismen in den polymeren Netzwerken oder durch Reinkubation ist die Möglichkeit gegeben, die katalytische Aktivität des Biokatalysators im Verlauf mehrerer Umsetzungen noch zu steigern.

Die Halbwertszeit, die Zeit in der die Zellen noch 50 % ihrer ursprünglichen Aktivität zeigen, ist ein Maß für die katalytische Stabilität der Biokatalysatoren bei aufeinanderfolgenden Reaktionsansätzen. Die Halbwertszeit eines Biokatalysators wird u.a. von der Art der immobilisierten Mikroorganismen und dem Immobilisierungsverfahren bestimmt. Die in der Literatur genannten Halbwertszeiten belaufen sich üblicherweise auf einige Wochen.

Während die freien C. simplex-Zellen als Trockenpulver mehrere Monate ihre enzymatische Aktivität behalten, verliert die aus den Zellen isolierte und gereinigte Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase in wässriger, neutraler Lösung bei 5°C innerhalb von 4 Stunden bereits 50 % ihrer ursprünglichen Aktivität (39). In Gegenwart von Substrat ist das isolierte Enzym stabiler. Der Verlust der enzymatischen Aktivität beträgt bei 5°C in 20 Stunden etwa 25 %.

Die Halbwertszeit der *C. simplex*-Immobilisate I-A2/1, I-B1/1, IIb und II-co3b wurde in verschiedenen Substratlösungen bestimmt, die die folgende Zusammensetzung hatten:

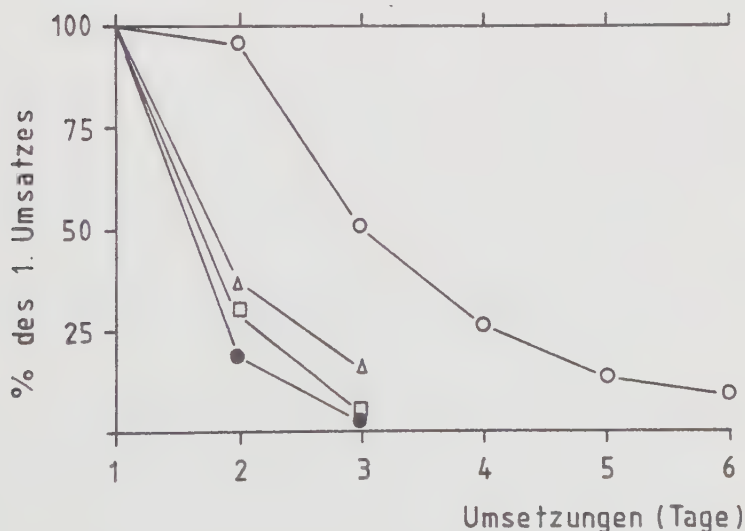
- a) $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison, 0,2 bis $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion, 1 % (v/v) DMF in Phosphat-Puffer (pH 6,8)
- b) $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison (mikronisiert), $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion (in fester Form) in Phosphat-Puffer (ohne DMF)
- c) $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison, $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ N-Methylphenazonium-methosulfat, 1 % DMF in Phosphat-Puffer
- d) $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison, 1 % DMF in Phosphat-Puffer (ohne Menadion)
- e) $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison (mikronisiert) in Phosphat-Puffer (ohne Menadion und DMF).

Nach jeweils 24 stündiger Steroidumsetzung mit 100 mg *C. simplex*-Immobilisat in den Substratlösungen a) bis e) bei 30°C und 160 U/min wurde die Prednisolon-Konzentration bestimmt. Mittels eines engmaschigen Nylon-Siebes wurden die Immobilisatpartikel von den Reaktionslösungen abgetrennt. Die Substratlösungen wurden nach jedem Reaktionsansatz erneuert und das mit Phosphat-Puffer gewaschene Immobilisat erneut zur Steroidumwandlung eingesetzt.

Bestimmung der Halbwertszeit der C. simplex-Immobilisate
in der Substratlösung a)

Der von den C. simplex-Immobilisaten nach 24 stündiger Steroidumsetzung in der Substratlösung a) erreichte Umsatz zu Prednisolon ist in Abb. 24 gegen die Anzahl der mit ein und derselben Immobilisatprobe durchgeführten Reaktionsansätze aufgetragen.

Abb. 24: Wiederholte Steroidtransformation mit den C. simplex-Immobilisaten zur Bestimmung der Halbwertszeit
Substratlösung: $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison, $0,2$ bis $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion, 1% DMF in Phosphat-Puffer



○ I-A2/1-C. simplex; □ I-B1/1-C. simplex;
Δ IIb-C. simplex; ● II-co3b-C. simplex.

Die Steroidumsetzungen erfolgten mit jeweils 100 mg C. simplex-Immobilisat.

Wie aus Abb. 24 zu ersehen ist, zeigten die C. simplex-Immobilisate I-A2/1, I-B1/1, IIb und II-co3b bei den wiederholt durchgeführten Reaktionsansätzen nur eine geringe enzymatische Stabilität. Die Halbwertszeit betrug in der Substratlösung a) nur 2 bis 3 Tage.

In einer mit dem Immobilisat I-B1/1-C. simplex weiterführenden Untersuchung wurde gefunden, daß auch geringere Konzentrationen an Menadion ($0,05 \text{ mmol l}^{-1}$) die enzymatische Stabilität bei den aufeinanderfolgenden Reaktionsansätzen verminderte. Diese Beobachtung wurde auch von Larsson et al. (112) gemacht und von ihnen auf die Bildung von Peroxiden und Superoxiden zurückgeführt, die aus chinoiden Verbindungen entstehen könnten (113).

Bestimmung der Halbwertszeit der C. simplex-Immobilisate in den Substratlösungen b) und c)

Die Steroidumsetzungen in der Substratlösung b) ergaben bei aufeinanderfolgenden Reaktionsansätzen ebenfalls eine Halbwertszeit von 2 bis 3 Tage.

Die Halbwertszeit ließ sich in keinem Falle erhöhen, wenn den Substratlösungen Menadion als Cofaktor zugesetzt wurde.

Wurde N-Methylphenazonium-methosulfat als Cofaktor der Substratlösung (Substratlösung c)) zugesetzt, betrug die Halbwertszeit ebenfalls nur 2 Tage.

Die mit der Substratlösung c) ermittelte Halbwertszeit der C. simplex-Immobilisate deutet darauf hin, daß neben der von Larsson et al. (112) für die geringe Langzeit-Stabilität verantwortlich gemachten Bildung von Peroxiden noch weitere Einflüsse wirksam sind.

Es wäre denkbar, daß der in die Zelle eindiffundierte Cofaktor vor oder nach seiner enzymatischen Reduktion mit Bestandteilen der Zelle eine Redoxreaktion eingeht und damit

die Lebensfähigkeit oder die katalytische Aktivität der Zelle durch eine Veränderung von Zellbestandteilen beeinträchtigt.

Bestimmung der Halbwertszeit der C. simplex-Immobilisate
in der Substratlösung d)

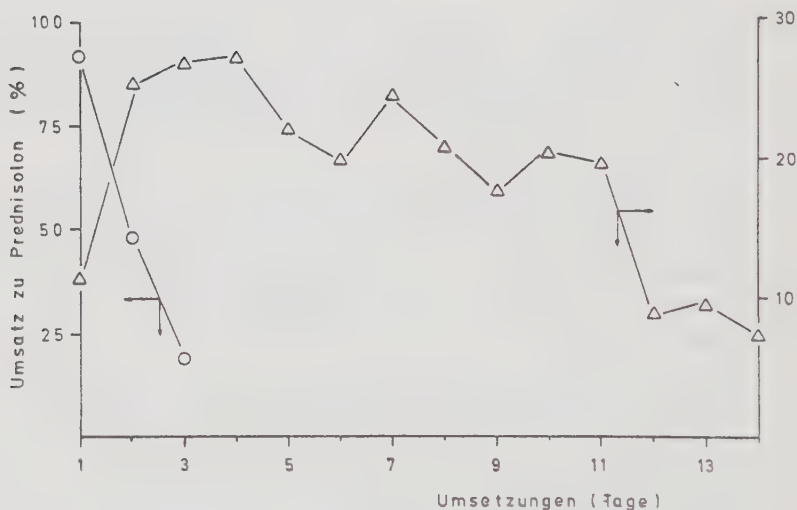
Die enzymatische Stabilität der C. simplex-Immobilisate bei wiederholten Reaktionsansätzen erhöhte sich in auffälliger Weise, wenn die Steroidumsetzungen ohne Zusatz eines Cofaktors durchgeführt wurden. Diese Untersuchungen erfolgten in Substratlösungen mit $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison und 1 % DMF. Mit derselben Immobilisatprobe wurden 14 aufeinanderfolgende je 24 stündige Substratumsetzungen durchgeführt (Abb. 25). Die Substratlösungen wurden nach jedem Umsatz erneuert und das Immobilisat nach Waschen mit Phosphat-Puffer erneut zur Steroidumwandlung verwendet.

Wie aus Abb. 25 hervorgeht, erhöhte sich der Umsatz zu Prednisolon vom ersten zum zweiten Reaktionsansatz um mehr als das Doppelte. Er erhöhte sich in geringerem Maße mitunter auch während der weiteren Umsetzungen. Da hier die Reaktionsbedingungen der Steroidumsetzungen denen der Inkubation gleichen, liegt der beobachtete Anstieg der Prednisolon-Bildung wahrscheinlich in einer erneuten Enzyminduktion begründet. Der maximale Umsatz zu Prednisolon lag bei dieser Untersuchung jedoch nur bei 28 % (bezogen auf die eingesetzte Menge Hydrocortison). Die Halbwertszeit erhöhte sich unter diesen Reaktionsbedingungen auf 14 Tage.

Zum Vergleich wurde in Abb. 25 das katalytische Verhalten desselben Immobilisates aufgetragen, dessen Substratlösung hier jedoch zusätzlich $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion enthielt.

Abb. 25: Langzeit-Stabilität des Immobilisates I-91/1-
C. simplex bei wiederholten Steroidumsetzungen

- △ Substratlösung: $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison,
1 % DMF in Phosphat-Puffer (ohne Cofaktor)
- Substratlösung wie oben, jedoch zusätzlich
 $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion



Die Steroidumsetzungen erfolgten mit jeweils 100 mg
C. simplex-Immobilisat.

Bestimmung der Langzeit-Stabilität der C. simplex-Immobilisate in der Substratlösung e)

Die katalytische Langzeit-Stabilität der C. simplex-Immobilisate bei aufeinanderfolgenden Reaktionsansätzen ließ sich durch Steroidumsetzungen in Substratlösungen, die weder einen Cofaktor noch ein organisches Lösungsmittel enthielten (Substratlösung e)), beträchtlich erhöhen. Die toxischen Nebenwirkungen organischer Lösungsmittel, insbesondere des DMF, wurden bereits beschrieben (siehe 3.13). Sie ließen sich ausschließen, indem die Substratlösungen Hydrocortison in fester Form enthielten.

Die Steroidtransformation mit festem Substrat ist als "Pseudocrystallofermentation" bekannt und wurde von Kondo und Masuo (114) bei der Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon mit freien C. simplex-Zellen beschrieben. Auch mit in Calcium-Alginat (51) und in Collagen (53) immobilisierten C. simplex-Zellen wurden Steroidtransformationen in der Technik der pseudokristallinen Fermentation durchgeführt.

Bei der pseudokristallinen Fermentation kann es zweckmäßig sein, das mikronisierte Steroid zusätzlich noch zu emulgieren. Als Emulgationshilfen eignen sich nichtionogene Emulgatoren, wie z.B. Ethylenoxyaddukte oder Fettsäureester von Polyglykolen.

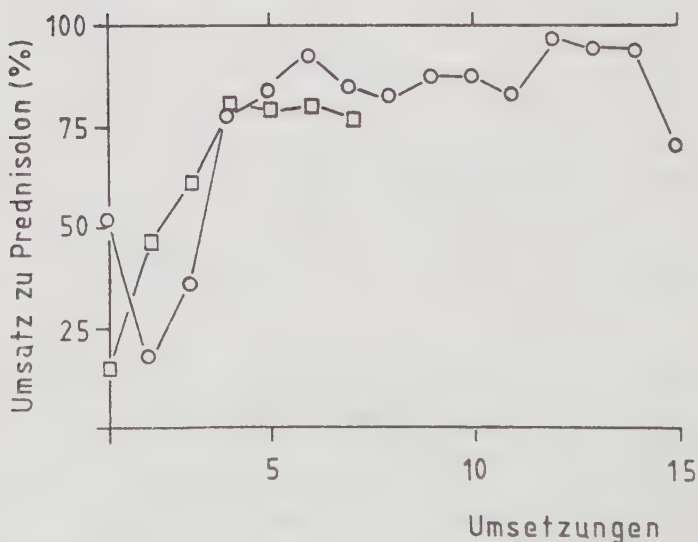
Zu je 100 mg der C. simplex-Immobilisate I-A1/1, I-A2/1, I-B1/1, IIb und II-co3b wurden 36,2 mg in Phosphat-Puffer suspendiertes mikronisiertes Hydrocortison gegeben ($2,0 \text{ mmol l}^{-1}$) und die Reaktionslösung bei 30°C 24 Stunden mit 160 U/min geschüttelt. Nach der Umsetzung wurde das als feiner Niederschlag ausgefallene Prednisolon durch ein engmaschiges Nylon-Sieb von den C. simplex-Immobilisaten abgetrennt. Nach Waschen der Immobilisate mit Phosphat-Puffer wurden die Immobilisatproben erneut zu weiteren Steroidumwandlungen

eingesetzt. Nach vier je 24 stündigen Steroidumsetzungen wurden die Immobilisate während einer dreitägigen Ruhezeit in Phosphat-Puffer ohne Hydrocortison-Zusatz bei 30°C bzw. bei 4°C gelagert. Danach erfolgten weitere Steroidumsetzungen in der gleichen Weise.

Die bei dieser Untersuchung mit den C. simplex-Immobilisaten erzielten Umsätze zu Prednisolon nach je 24 stündiger Reaktion mit mikronisiertem Hydrocortison sind in den Abb. 26 - 28 gegen die Zahl der Reaktionsansätze aufgetragen.

Abb. 26: Langzeit-Stabilität der Immobilisate I-A1/1-C. simplex und I-A2/1-C. simplex bei wiederholten Reaktionsansätzen

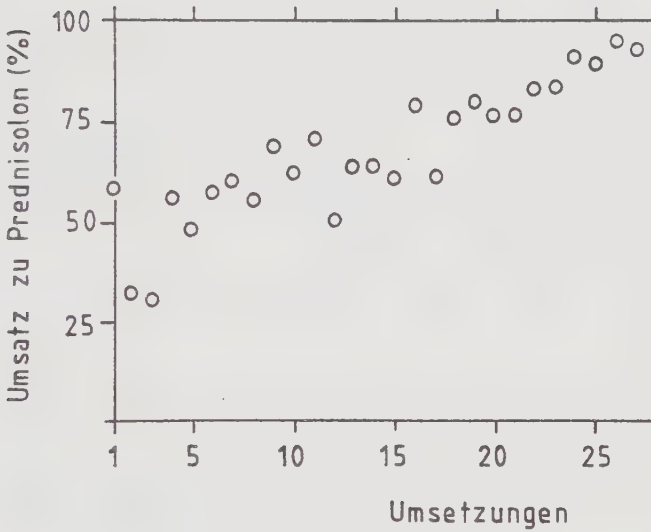
Substratlösung: 2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison (mikronisiert) in Phosphat-Puffer (ohne Cofaktor und DMF)



□ I-A1/1-C. simplex; ○ I-A2/1-C. simplex.

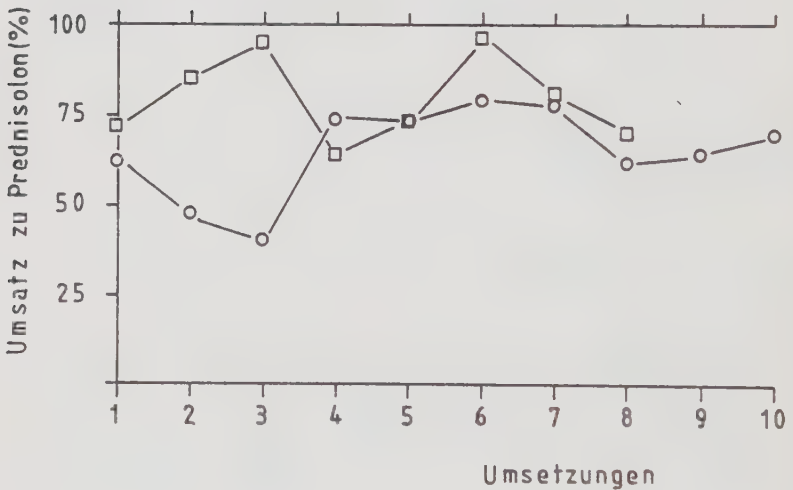
Die Steroidumsetzungen erfolgten mit jeweils 100 mg C. simplex-Immobilisat.

Abb. 27: Langzeit-Stabilität des Immobilisates I-B1/1-C. simplex bei wiederholten Reaktionsansätzen
Substratlösung: $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison (mikronisiert) in Phosphat-Puffer (ohne Cofaktor und DMF)



Die Steroidumsetzungen erfolgten mit 100 mg I-B1/1-C. simplex-Immobilisat.

Abb. 28: Langzeit-Stabilität der Immobilisate IIb-C. simplex und II-co3b-C. simplex bei wiederholten Reaktionsansätzen
Substratlösung: 2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison (mikronisiert) in Phosphat-Puffer (ohne Cofaktor und DMF)



- IIb-C. simplex-Immobilisat;
○ II-co3b-C. simplex-Immobilisat.

Die Steroidumsetzungen erfolgten mit jeweils 100 mg C. simplex-Immobilisat.

Wie aus dem in den Abb. 26 - 28 dargestellten Verhalten der C. simplex-Immobilisate bei wiederholten Reaktionsansätzen hervorgeht, zeigten alle Immobilisate bei den Steroidumwandlungen mit festem Hydrocortison eine bemerkenswerte Langzeit-Stabilität.

Da die Aktivität der C. simplex-Immobilisate sich während der Untersuchungen nicht verringerte, muß hier auf die Angabe einer Halbwertszeit verzichtet werden.

Das Verhalten der Immobilisate bei den Steroidumsetzungen mit festem Hydrocortison wurde am Beispiel des Immobilisates I-B1/1-C. simplex eingehender untersucht.

Während der mit ein und derselben Immobilisatprobe I-B1/1-C. simplex durchgeführten 27 Steroidumsetzungen innerhalb von 7 Wochen erhöhte sich der Umsatz zu Prednisolon von 57,7 % beim ersten Reaktionsansatz auf 93,2 % beim 27. Reaktionsansatz.

Die Aktivität der immobilisierten C. simplex-Zellen zu Beginn der Untersuchungen betrug hier $36,3 \mu\text{mol/g}_{\text{Imm.}} \cdot \text{h}$ bzw. $46,0 \mu\text{mol/g}_{\text{Bakt.}} \cdot \text{h}$. Nach dem 25. Umsatz betrug die Aktivität $93,0 \mu\text{mol/g}_{\text{Imm.}} \cdot \text{h}$ bzw. $117,7 \mu\text{mol/g}_{\text{Bakt.}} \cdot \text{h}$. Die Aktivität des Immobilisates erhöhte sich demnach während der Umsetzungen um 256,2 %.

Bei der Bestimmung der Aktivität wurde angenommen, daß der Zellgehalt im Immobilisat während der Steroidumsetzungen unverändert blieb. Diese Annahme wurde durch den während dieser Zeit in etwa gleichgebliebenen Stickstoff-Gehalt der Immobilisatprobe bestätigt (Tab. 15).

Der nach den Steroidumsetzungen höhere Kohlenstoff- und Wasserstoff-Gehalt des Immobilisates ist wahrscheinlich auf fest adsorbierte Steroids-substanzen zurückzuführen, die mit Phosphat-Puffer nicht aus dem Immobilisat auszuwaschen sind.

Die Ursache der Aktivitätszunahme während dieser Untersuchung liegt wahrscheinlich in einer weiteren Enzyminduktion begründet, die durch die Abwesenheit zellschädigender Substanzen ermöglicht wurde.

Tab. 15: Elementaranalytische Zusammensetzung des
Immobilisates I-B1/1-C. simplex

	Zellgehalt			
	% C	% H	% N	(g _{Bakt.} /g _{Imm.})
vor den Steroid- umsetzungen	39,93	6,23	7,05	0,76
nach 31 Steroid- umsetzungen in 11 Wochen a)	45,79	6,98	6,56	0,71

a) Die elementaranalytische Zusammensetzung dieser Immobilisatprobe wurde nach den weiteren mit derselben Immobilisatprobe durchgeführten Steroidumsetzungen bestimmt, die in Tab. 16 beschrieben sind.

Die über 11 Wochen andauernden Steroidumsetzungen mit ein und derselben Immobilisatprobe, bei der die Immobilisatpartikel ständig mit 160 U/min in ihrer Substratlösung bewegt wurden (insgesamt über 1800 Stunden) führten zu einem etwa 35 proz. Verlust an Immobilisat am Ende der Umsetzungsversuche, der teilweise durch Abrieb und durch das häufige Abtrennen der Immobilisatpartikel von der Substratlösung erklärt werden kann.

Die maximal mögliche Beladung des Bioreaktors mit mikronisiertem Hydrocortison wurde mit dem Immobilisat I-B1/1-C. simplex untersucht. Zu 100 mg des C. simplex-Immobilisates wurden die in Tab. 16 angegebenen Hydrocortison-Mengen in mikronisierter Form gegeben und die Suspensionen bei 30°C mit 160 U/min geschüttelt. Die Reaktionszeiten der Steroidumwandlungen wurden in Abhängigkeit der Substrat-

Konzentration verlängert.

Tab. 16: Ermittlung der maximal möglichen Beladung des Bioreaktors mit mikronisiertem Hydrocortison
a)

Hydrocortison/ 50 ml Phosphat- Puffer		Reaktionszeit	Umsatz zu Prednisolon
(mg)	(mmol l ⁻¹)	(h)	(%)
72,4	4	48	82,6
181	10	118	89,7
362	20	170	71,2
600	33,1	400	37,9

a) Die Untersuchungen erfolgten nacheinander mit derselben Immobilisatprobe I-B1/1-C. simplex im Anschluß an die Untersuchung der Langzeit-Stabilität, dargestellt in Abb. 27.

Bei Hydrocortison-Konzentrationen über 20 mmol l⁻¹ erfolgte ein geringerer Umsatz zu Prednisolon, wobei als Ursache am ehesten eine Diffusionshemmung durch Kristallisation von Substrat und Produkt auf der Katalysatoroberfläche und damit das Verstopfen der Poren des Biokatalysators vermutet werden kann.

Selbst nach 31 Steroidumsetzungen innerhalb von 78 Tagen mit ein und derselben Immobilisatprobe zeigte das Immobilisat I-B1/1-C. simplex keinen Verlust seiner enzymatischen Aktivität.

Die Isolierung des Reaktionsproduktes der Steroidumwandlung erfolgte durch Extraktion der wäßrigen Substratlösung mit Essigsäureethylester oder Methylisobutylketon.

Vom mehrfach aus Aceton umkristallisierten Prednisolon wurde der Schmelzpunkt bestimmt und ein IR-Spektrum aufgenommen.

Fp: 237 - 240°C (Lit.: 240 - 241°C) (40)

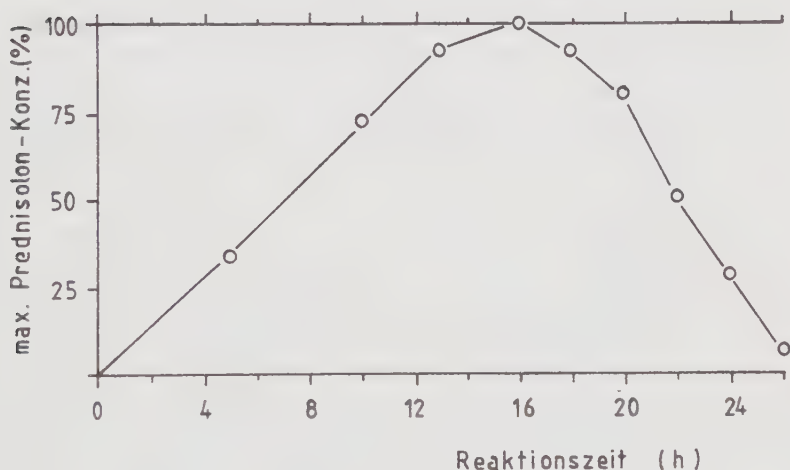
IR-Absorptionen und Bandenzuordnung von Prednisolon:

<u>Absorptionsbereich (cm⁻¹)</u>	<u>Zuordnung</u>
3400	✓ (-OH)
2940	✓ (-CH ₂ , -CH ₃)
1710	✓ (20-Carbonyl)
1603, 1618, 1658	✓ (Δ ^{1,4} -Dien-3-on).

Bei den Steroidumsetzungen mit den C. simplex-Immobilisaten in Substratlösungen, die keinen Cofaktor enthielten, wurde in unregelmäßiger Folge ein Abbau von bereits gebildetem Prednisolon beobachtet.

In Abb. 29 ist die Bildung und der darauffolgende Abbau von Prednisolon in Abhängigkeit der Reaktionszeit dargestellt. Diese Untersuchung erfolgte mit dem Immobilisat I-B1/1-C. simplex in der Substratlösung d).

Abb. 29: Bildung und Abbau von Prednisolon in der Substratlösung d)



Messung mit 100 mg I-B1/1-C. simplex-Immobilisat in 50 ml Substratlösung, bestehend aus $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison und 1 % DMF in Phosphat-Puffer (ohne Menadion), 30°C , 160 U/min.

Der Prednisolon-Abbau durch die immobilisierten C. simplex-Immobilisate verringerte sich mit der Zeit bei aufeinanderfolgenden Stereoidumsetzungen.

Bei Stereoidumsetzungen in cofaktor-freien Substratlösungen mit $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ festem Hydrocortison wurde bei einer der ersten Umsetzungen, die hier 48 Stunden verlief, nur noch ein geringer Anteil von 1 % der theoretisch möglichen Prednisolon-Menge in der Reaktionslösung gefunden (Abb. 30). Hydrocortison ließ sich nicht mehr nachweisen. Nach dem 25. Umsatz mit derselben Immobilisatprobe ließen sich jedoch nach einem 72 stündigen Reaktionsumsatz noch 76,2 % der theoretisch möglichen Prednisolon-Menge in der Reaktionslösung nachweisen.

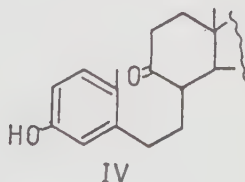
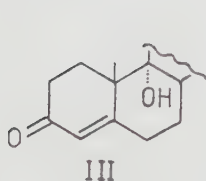
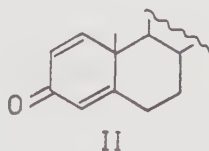
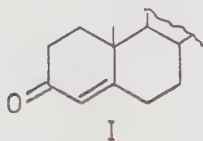
Abb. 30: Bildung und Abbau von Prednisolon in der Substratlösung e)



Messung mit 100 mg I-81/1-C. simplex-Immobilisat in 50 ml Substratlösung, bestehend aus $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ mikronisiertem Hydrocortison in Phosphat-Puffer (ohne Menadion und DMF), 30°C , 160 U/min.

Die Ursache der Verringerung des Prednisolon-Abbaus durch die immobilisierten C. simplex-Zellen liegt wahrscheinlich in der Induktion der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase begründet. Die Konzentration der Δ^1 -Dehydrogenase in den immobilisierten Zellen erhöht sich dadurch im Verlaufe der Umsetzungen. Bei einer unveränderten Konzentration der Prednisolon-abbauenden Enzyme in den Zellen wird die Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase daher den Reaktionsverlauf allein bestimmen. Nicht auszuschließen ist aber auch eine durch die lang andauernde Reaktionszeit verursachte Inaktivierung der Prednisolon-abbauenden Enzyme.

Sih (115) beschreibt einen möglichen Abbauweg von Steroid-substanzen durch Mikroorganismen, die Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität besitzen. Mit *Norcadia restrictus* konnte er die Umwandlung von Progesteron (I) zu 1-Dehydroprogesteron (II) und 9 α -Hydroxyandrostendion (III) nachweisen. In einer nachfolgenden Reaktion führte die Oxidation der 9 α -Hydroxylgruppe zu einer Öffnung des Steroid-B-Ringes und die Aromatisierung des Steroid-A-Ringes führte schließlich zur Bildung von 9,10-seco-3-hydroxy-1,3,5 (10)-androstatrien-9,17-dion (IV).



Sih konnte nachweisen, das auch andere Mikroorganismen mit Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität wie *Corynebakterium simplex*, *Bacterium cyclooxydans*, *Pseudomonas testosteroni* und *Mycobacterium rhodochrous* ebenfalls eine 9α -Hydroxylierungsreaktion katalysieren können. Der mit *Norcadia restrictus* formulierte Abbaumechanismus für Progesteron läßt sich daher wahrscheinlich auch auf andere Mikroorganismen mit Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität übertragen.

Die höhere Reaktionsgeschwindigkeit der Δ^1 -Dehydrogenierungsreaktion im Vergleich zur 9α -Hydroxylierung könnte erklären, daß erst eine längere Reaktionszeit zu einem Abbau von Hydrocortison und Prednisolon durch die immobilisierten *C. simplex*-Zellen führte.

3.15 Untersuchungen zur Vermehrungsfähigkeit von C. simplex-Zellen in den polymeren Netzwerken

Immobilisierte Mikroorganismen zeigen in der Regel ihre enzymatischen Funktionen auch im ruhenden Zustand, also in Abwesenheit von Nährstoffen, die ein Wachstum der Zellen ermöglichen.

Die Vermehrungsfähigkeit der Zellen im immobilisierten Zustand ist zwar keine Voraussetzung für die biokatalytische Aktivität der Immobilisate, jedoch kann das Wachstum der Zellen im polymeren Netzwerk als Charakteristikum für ein schonendes Immobilisierungsverfahren, das die Überlebensfähigkeit der Zellen ermöglicht, dienen.

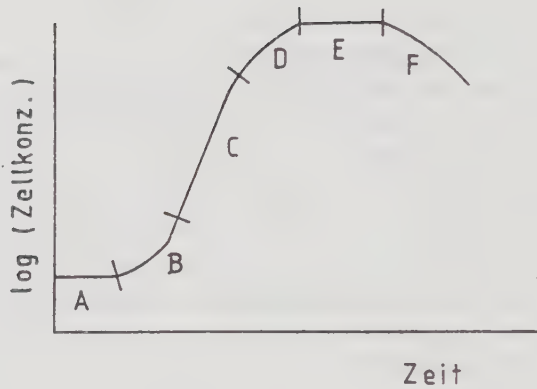
Ein Wachstum der Zellen im Immobilisat ist hingegen notwendig bei der Durchführung von Multienzymreaktionen.

Unter Wachstum versteht man definitionsgemäß die geordnete Vermehrung der Masse oder der Anzahl aller Zellkomponenten. Die Zellvermehrung ist eine häufige, jedoch eine nicht bei allen Mikroorganismen, wie z.B. manchen Schleimpilzen, notwendige Folge des Wachstums.

Das Wachstum einer Zellkultur kann durch die Angabe der Keimkonzentration (Zahl der vermehrungsfähigen Keime pro Volumeneinheit) oder der Bakteriendichte (Trockengewicht der Zellen pro Volumeneinheit) erfaßt werden (116).

Die Keimkonzentration läßt sich durch Messung der Lichtabsorption oder Lichtstreuung nur bei frei in Lösung befindlichen Zellen bestimmen. Die Bakteriendichte kann durch eine Trockengewichtsbestimmung oder indirekt durch Bestimmung des Stickstoff-Gehaltes der Zellkultur ermittelt werden. Sie eignet sich daher auch zur Bestimmung der Zellmenge in den Immobilisaten (siehe 3.10).

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen ist nicht konstant und wird durch den folgenden Verlauf der Wachstumskurve charakterisiert:



Kurvenabschnitt	Phase	Wachstums- geschwindigkeit
A	Latenz- oder Lag-Phase	null
B	Beschleunigungsphase	ansteigend
C	Logarithmische Phase	konstant
D	Verzögerungsphase	abfallend
E	Stationäre Phase	null
F	Absterbephase	negativ

Während bei den freien Zellkulturen das Wachstum im allgemeinen durch bestimmte Milieufaktoren, wie einer Verarmung der Nährstoffe, durch eine Anreicherung toxischer Produkte oder durch eine ungünstige Ionenstärke oder pH-Wert limitiert wird, erweitern sich die das Wachstum

begrenzenden Faktoren bei den immobilisierten Zellen durch die geometrischen Abmessungen des polymeren Netzwerkes. Das Wachstum der Zellen in den Immobilisaten wird dadurch bestimmt, ob den nachwachsenden Zellen ausreichend Platz zur Verfügung steht. Die Wachstumsgeschwindigkeit wird auch davon abhängig sein, bei welchem ausgehenden Niveau der Zellbeladung des Immobilisates die weitere Vermehrung der Zellen stattfindet. Einen Einfluß auf die Zellvermehrung wird auch das Immobilisierungsverfahren ausüben, da nur äußerst schonend durchgeführte Immobilisierungen die Lebensfähigkeit aller Zellen garantieren können.

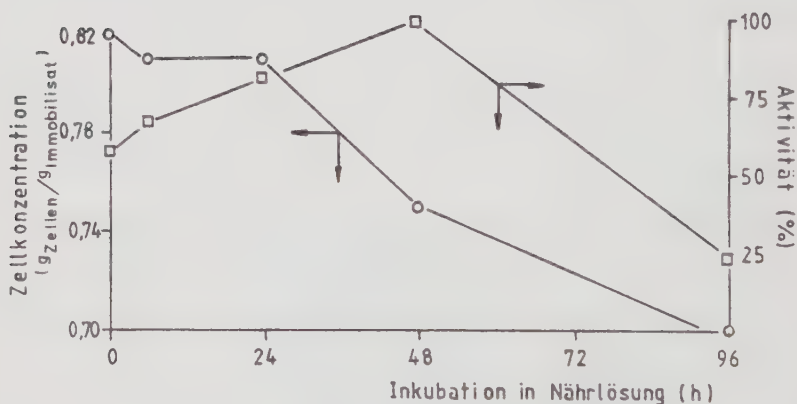
Das Wachstum immobilisierter Zellen wurde bisher hauptsächlich an in ionotropen Gelen eingeschlossenen Zellen untersucht. Das Netzwerk ionotroper Gele läßt sich durch Zugabe einwertiger Ionen unter Freisetzung der eingeschlossenen Zellen auflösen, deren Menge mit der ursprünglich immobilisierten Zellmenge verglichen werden kann. In mehreren Publikationen wurde von einem Wachstum der Zellen im immobilisierten Zustand berichtet (51, 99).

Ein Beweis für die Vermehrungsfähigkeit der in dem Polymerisat I-B1/1 immobilisierten *C. simplex*-Zellen in Gegenwart eines geeigneten Nährmediums wurde durch Bestimmung des Stickstoff-Gehaltes der Immobilisate als Funktion der Inkubationsdauer sowie durch parallel durchgeführte Aktivitätsuntersuchungen gefunden.

Das Immobilisat I-B1/1-*C. simplex* wurde 24 Stunden in $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison-Lösung und anschließend in einem Nährmedium aus 0,5 % (w/v) Pepton (aus Sojabohnenmehl, papainisch verdaut) in Phosphat-Puffer inkubiert. Nach der Inkubation in der Nährlösung wurde die Aktivität der Immobilisate in einer Substratlösung aus $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison, $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion und 1 % DMF bestimmt. Weiterhin wurde der Stickstoff-Gehalt der Immobilisatproben in Abhängigkeit der Inkubationsdauer ermittelt.

In Abb. 31 ist die aus dem Stickstoff-Gehalt ermittelte Zellkonzentration und die Aktivität der Immobilisatproben in Abhängigkeit der Inkubationsdauer in der 0,5 proz. Peptonlösung aufgetragen.

Abb. 31: Abhängigkeit der Zellkonzentration und der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität des Immobilisates I-B1/1-C. simplex von der Inkubationsdauer in Nährlösung



Inkubation in 0,5 % (w/v) Pepton (aus Sojabohnenmehl, papainisch verdaut) in Phosphat-Puffer (pH 6,8). Aktivitätsbestimmung mit 100 mg Immobilisat in 50 ml Substratlösung, bestehend aus 2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 0,5 mmol l⁻¹ Menadion, 1 % DMF in Phosphat-Puffer.

Die bei dieser Untersuchung beobachtete Verringerung der Zellkonzentration in den Immobilisatproben nach der Inkubation in der Nährlösung ist eventuell auf ein Freisetzen von an der Partikeloberfläche locker fixierten Zellen oder von aus abgestorbenen Zellen stammenden Zellbestandteilen zurückzuführen. Genaue Untersuchungen zeigten, daß die freigesetzten Zellen oder Zellbestandteile keine katalytische Aktivität besaßen.

Ein Wachstum von immobilisierten Zellen wird am ehesten dann möglich sein, wenn in einem weitmaschigen polymeren Netzwerk anfänglich nur eine geringe Zellmenge eingeschlossen wurde. Bei dem Immobilisat I-B1/1-C. simplex, das für die nachfolgende Untersuchung nur 0,117 g C. simplex-Zellen/g Immobilisat enthielt, wurde die Zellkonzentration im Immobilisat in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer in 0,5 proz. Peptonlösung bestimmt. Die Zellkonzentration wurde aus dem Stickstoff-Gehalt der Immobilisatproben ermittelt und ist in Tab. 17 wiedergegeben. Die parallele Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Immobilisate war aufgrund der geringen Zellkonzentration nicht möglich.

Die Zellkonzentration erhöhte sich hier, wie aus Tab. 17 hervorgeht, nach 24 stündiger Inkubation in Gegenwart eines Nährmediums auf das 1,22 fache der Zellkonzentration vor der Inkubation. Auch hier wurde nach längerer Inkubationszeit - im Gegensatz zu den Steroidumsetzungen - ein Teil der Zellen oder Zellbestandteile freigesetzt.

Tab. 17: Veränderung der Zellkonzentration im Immobilisat I-B1/1-C. simplex ($0,117 \text{ g}_{\text{Zell.}}/\text{g}_{\text{Imm.}}$) in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer in Nährlösung

Inkubations- dauer	N-Gehalt des Immobilisates	Zellkonzentration a)	
(h)	(%)	(g C. simplex/ g Immobilisat)	in % der Anfangskonz.
0	1,12	0,117	100,0
6	1,22	0,128	109,4
24	1,37	0,143	122,2
48	0,88	0,092	78,6

a) N-Gehalt der freien C. simplex: 9,55 %.

Die Wachstumsgeschwindigkeit einer Zellkultur wird üblicherweise durch die Angabe "Generationen pro Stunde" ausgedrückt. Für Organismen, die sich durch binäre Teilung vermehren, bezeichnet der Begriff "Generation" die Verdoppelung der ursprünglichen Zellmenge.

Die Zellmenge N steht daher mit der Zahl der Zellgenerationen G über Gl. 10 in einer exponentiellen Beziehung.

$$(10) \quad N = N_0 \cdot 2^G$$

N: Zellmenge zur Zeit $t=0$

N_0 : Zellmenge zur Zeit t

G: Zahl der Generationen

Mit der logarithmierten Form der Gl. 10 läßt sich aus den Werten der Tab. 17 hier eine Wachstumsgeschwindigkeit von etwa 0,29 Generationen / 24 h bzw. 0,012 Generationen / h errechnen. Im Vergleich dazu beträgt die Wachstumsgeschwindigkeit

keit der freien C. simplex-Zellen etwa 1,5 Generationen pro Stunde (39).

Die eingeschlossenen C. simplex-Zellen zeigten somit bei dieser Untersuchung eine 125-fach geringere Wachstumsgeschwindigkeit als die freien C. simplex-Zellen.

3.16 Einfluß von Nährmedien auf die Stabilität der
Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten
C. simplex-Zellen

Mit den immobilisierten C. simplex-Zellen ließen sich - wie in 3.14 beschrieben - über einen beträchtlichen Zeitraum Steroidtransformationen durchführen, ohne daß die immobilisierten Zellen in einem Nährmedium inkubiert wurden. In mehreren Publikationen wurde von einem aktivierenden Effekt verschiedener Nährmedien auf die Stabilität der Steroid- Δ 1-Dehydrogenase von C. simplex-Zellen berichtet (49, 51).

Es wurde daher auch der Einfluß von Nährmedien auf die katalytische Stabilität der Δ 1-Dehydrogenase der in den PVA-Derivaten immobilisierten C. simplex-Zellen untersucht. Die Untersuchungen erfolgten mit den Immobilisaten I-A2/1-C. simplex und I-B1/1-C. simplex.

Bei den Untersuchungen wurde das Nährmedium den Substratlösungen direkt zugesetzt oder die immobilisierten Zellen wurden zwischen zwei aufeinanderfolgenden Steroidumwandlungen in der Nährlösung reaktiviert.

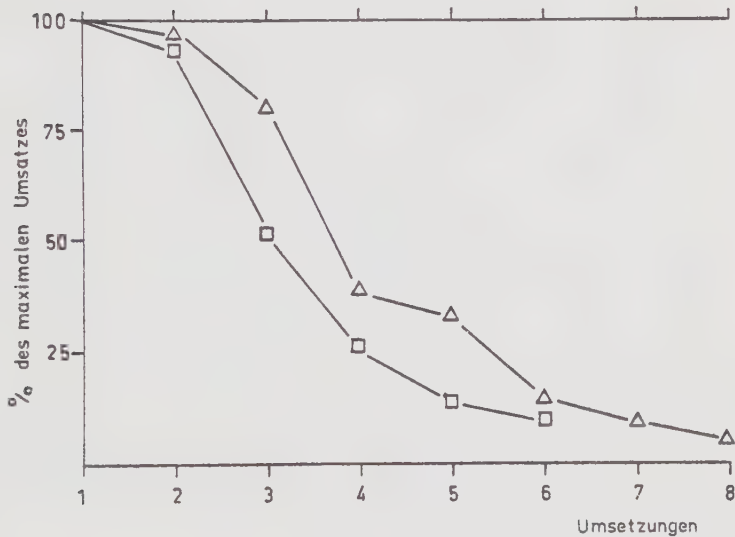
Nach jeweils 24 stündiger Steroidumwandlung mit dem Immobilisat I-A2/1-C. simplex in Substratlösungen ($2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison, $0,2 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion, 1 % DMF), die 0,2 % (w/v) Pepton als Nährmedium enthielten, wurde die in dieser Zeit gebildete Prednisolon-Menge bestimmt.

Die Immobilisatprobe wurde nach der Steroidumwandlung mit Phosphat-Puffer gewaschen und im Anschluß daran in einer neu hergestellten Substrat- und Nährlösung erneut zur Steroidumwandlung eingesetzt. In Abb. 32 sind die bei den Steroidumwandlungen erzielten Umsätze zu Prednisolon in % des Umsatzes des ersten Reaktionsansatzes gegen die Anzahl der durchgeführten Reaktionsansätze aufgetragen.

In vergleichender Weise sind die mit einer Immobilisatprobe

erzielten Umsätze zu Prednisolon aufgetragen, deren Substratlösung kein Nährmedium enthielt.

Abb. 32: Wiederholte Steroidumwandlungen in Substratlösungen mit und ohne Nährmedium



Messung mit 100 mg I-A2/1-C. simplex-Immobilisat in

□ Substratlösung ohne Nährmedium ($2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison, $0,2 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion, 1 % DMF in Phosphat-Puffer;

Δ Substratlösung mit Nährmedium (wie oben, jedoch mit 0,2 % Pepton).

Wie aus Abb. 32 zu ersehen ist, erhöhte sich die Halbwertszeit des Immobilisates I-A2/1-C. simplex von 3 auf etwa 4 Tage, wenn die Substratlösung ein Nährmedium enthielt. Doch machte sich auch bei dieser Untersuchung der destabilisierende Einfluß des Cofaktors auf die katalytische Langzeit-Stabilität der immobilisierten C. simplex-Zellen bemerkbar.

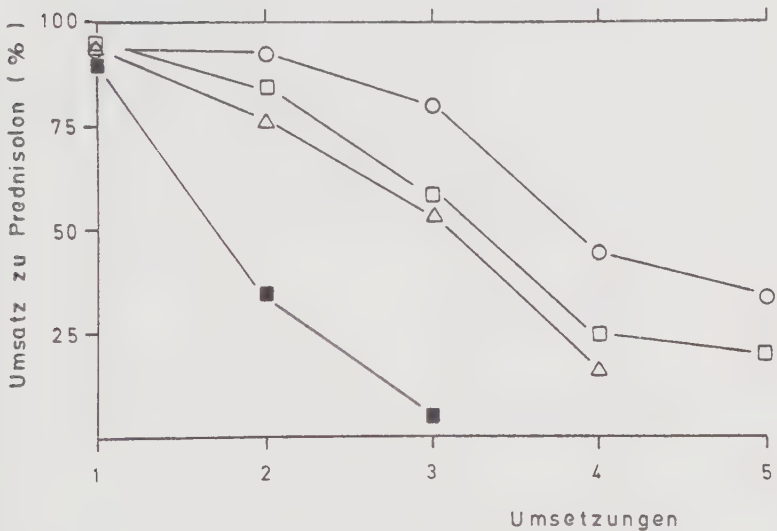
Der Einfluß von Nährmedien auf die Langzeit-Stabilität der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der immobilisierten C. simplex-Zellen wurde mit den Immobilisaten I-A2/1-C. simplex und I-B1/1-C. simplex eingehender untersucht. Nach jeweils 24 stündiger Steroidumwandlung mit den immobilisierten C. simplex-Zellen in $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison Lösungen ($0,2$ bzw. $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion, 1% DMF) wurde der Umsatz zu Prednisolon bestimmt. Danach wurden die Immobilisate in Nährlösungen verschiedener Zusammensetzung reaktiviert. Die Reaktivierungsversuche erfolgten während 24 Stunden bei 30°C unter aeroben Bedingungen. Nach der Reaktivierung wurden die Immobilisate mit Phosphat-Puffer gewaschen und der Umsatz zu Prednisolon nach erneuter 24 stündiger Steroidumwandlung bestimmt. Danach erfolgte wiederum eine 24 stündige Reaktivierung mit Nährlösung. Diese Cycles wurden wiederholt mit denselben Immobilisatproben durchgeführt. Die Nährlösungen bestanden wie folgt aus:

- a) $0,2 \%$ (w/v) Pepton (aus Sojabohnenmehl, papainisch verdaut)
- b) $0,5 \%$ Pepton
- c) $0,5 \%$ Pepton und $0,2 \%$ α -D-Glucose
- d) $0,5 \%$ Corn steep
 $0,1 \%$ Hefeextrakt (65 proz., pH 7)
 $0,05 \%$ Stärkezucker (flüssig, 60 proz.)

in Phosphat-Puffer (pH 6,8).

Zum Vergleich wurden Immobilisatproben nach den 24 stündigen Steroidumwandlungen mit Phosphat-Puffer ohne Nährlösung unter gleichen Bedingungen behandelt und dann mit ihnen die nächste Steroidumwandlung vollzogen (Abb. 33).

Abb. 33: Einfluß der Reaktivierung mit Nährlösungen auf die enzymatische Stabilität der immobilisierten *C. simplex*-Zellen



Messung mit 100 mg I-B1/1-*C. simplex*-Immobilisat in 50 ml Substratlösung wie in Abb. 6 angegeben.

Reaktivierung in 24 Stunden bei 30°C mit:

- 0,5 % Pepton (aus Sojabohnenmehl, papainisch verdaut);
- △ 0,5 % Pepton und 0,2 % α-D-Glucose;
- 0,5 % Corn steep, 0,1 % Hefeextrakt (65 proz., pH 7),
- 0,05 % Stärkezucker (flüssig, 60 proz.).

ohne Reaktivierung.

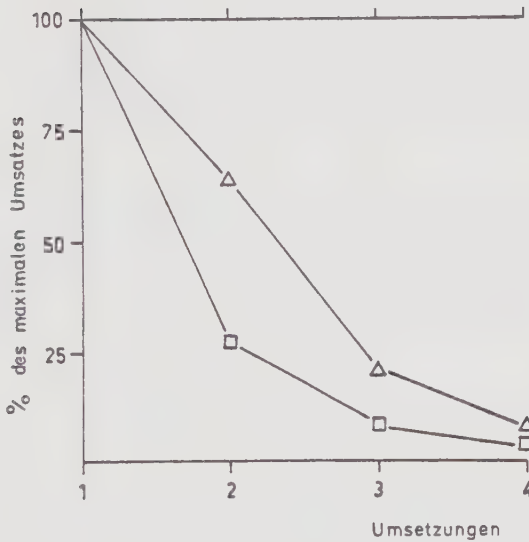
Es zeigte sich, daß die mit Nährlösung reaktivierten C. simplex-Immobilisate eine deutlich bessere enzymatische Stabilität bei den aufeinanderfolgenden Steroidumsetzungen aufwiesen als die nicht mit Nährlösung behandelten Immobilisatproben.

Das in der Nährlösung d) reaktivierte C. simplex-Immobilisat zeigte bei dieser Untersuchung die höchste enzymatische Stabilität bei den aufeinanderfolgenden Reaktionsansätzen.

In Abb. 34 ist die enzymatische Stabilität des mit Pepton (0,2 proz. in Phosphat-Puffer) reaktivierten I-A2/1-C. simplex-Immobilisates im Vergleich zu einer nicht reaktivierten Immobilisatprobe dargestellt.

Auch hier zeigten die immobilisierten C. simplex-Zellen eine bessere enzymatische Stabilität, wenn eine Reaktivierung mit Nährlösung zwischen den aufeinanderfolgenden Steroidumsetzungen durchgeführt wurde.

Abb. 34: Wiederholte Steroidumwandlung mit den immobilisierten C. simplex-Zellen (I-A2/1-C. simplex-Immobilisat) nach Reaktivierung mit Pepton



Messung mit 100 mg I-A2/1-C. simplex-Immobilisat.

△ Reaktivierung mit 0,2 % peptonhaltigem Phosphat-Puffer, 24 h bei 30°C;

□ ohne Reaktivierung.

Substratlösung: 2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 0,2 mmol l⁻¹ Menadion, 1 % DMF in Phosphat-Puffer (pH 6,8), 30°C.

3.17 Lagerstabilität der C. simplex-Immobilisate

Die Lagerstabilität der Immobilisate I-A2/1-C. simplex und I-91/1-C. simplex wurde unter verschiedenen Lagerbedingungen untersucht.

Nach den Steroidumwandlungen wurden die Immobilisatproben wie folgt aufbewahrt:

- a) bei 4°C unter 50 mmol l⁻¹ Phosphat-Puffer (pH 6,8)
- b) bei -20°C bis -25°C im gefrorenen Zustand
- c) bei -20°C bis -25°C als Lyophilisat.

Mit dem Immobilisat I-A2/1-C. simplex wurde nach 24 stündiger Steroidumwandlung der Umsatz zu Prednisolon bestimmt und die Steroidumwandlungen nach 30- und 60-tägiger Lagerung wiederholt. Die nach der Lagerung erzielten Umsätze zu Prednisolon sind in Tab. 18 angegeben.

Hier zeigte die bei -20°C bis -25°C im gefrorenen Zustand aufbewahrte Immobilisatprobe den niedrigsten Aktivitätsverlust.

Tab. 18: Lagerstabilität der Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität des Immobilisates I-A2/1-C. simplex

Lagerbedingung	Umsatz zu Prednisolon (%) nach		
	0	30	60 Tagen
4°C unter Phosphat-Puffer	90	19,8	0
-20°C bis -25°C im gefrorenen Zustand	90	42,8	1,4
-20°C bis -25°C als Lyophilisat	90	34,9	0,9

Messung mit 100 mg Immobilisat in 100 ml Substratlösung (2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 0,2 mmol l⁻¹ Menadion, 1 % DMF)

Umsatz bezogen auf die eingesetzte Hydrocortison-Menge.

Der Verlust der enzymatischen Aktivität des Immobilisates I-A2/1-C. simplex ist hier jedoch zum größeren Teil auf die desaktivierende Wirkung des Menadions bei den Steroidtransformationen und nicht auf die Lagerung selbst zurückzuführen.

Eine wesentlich bessere Stabilität unter den aufgeführten Lagerbedingungen zeigte das Immobilisat I-B1/1-C. simplex, wenn die Steroidumsetzungen mit mikronisiertem Hydrocortison ($2,0 \text{ mmol l}^{-1}$) ohne Zugabe eines Cofaktors durchgeführt wurden. Selbst nach 6 monatiger Lagerung zeigten die Immobilisatproben noch ihre vollständige katalytische Aktivität (Tab. 19).

Während der Untersuchungen erhöhte sich sogar der Umsatz zu Prednisolon. Dieses katalytische Verhalten der C. simplex-Immobilisate wurde bereits in 3.14 beschrieben und ist wahrscheinlich auf eine weitere Enzyminduktion zurückzuführen.

Tab. 19: Lagerstabilität der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase
Aktivität des Immobilisates I-B1/1-C. simplex

Lagerbedingung	Umsatz zu Prednisolon (%) nach					
	0	2	8	12	21	30 Wochen
4°C unter Phosphat-Puffer	57,7	54,2	68,4	84,7	90,4	93,9
-25°C im gefrorenen Zustand	57,7	49,9	59,9	76,2	78,3	86,1
-25°C als Lyophilisat	57,7	40,0	59,9	70,5	74,8	72,6

Messung mit 100 mg Immobilisat, Substratlösung: 50 ml, $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ mikronisiertes Hydrocortison in Phosphat-Puffer. (ohne Menadion und DMF).

Umsatz bezogen auf die eingesetzte Hydrocortison-Menge.

3.18 Weitere Untersuchungen zur Abhängigkeit der
katalytischen Aktivität der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase
der immobilisierten C. simplex-Zellen

Einige wichtige Methoden zur Immobilisierung von ganzen mikrobiellen Zellen gehen, wie in 3.3 erwähnt, von Photopolymeren oder photovernetzbaren Polymeren als Einschließungsmedium für Mikroorganismen aus. Beispielsweise wurden Streptomyces phaeochromogenes-Zellen in Polymere aus 2-Hydroxyethyl-methacrylat immobilisiert, wobei die Polymerisation durch energiereiche γ -Strahlen induziert wurde (117).

Die in der Literatur erwähnten Vernetzungsreaktionen von photovernetzbaren Polymeren werden ebenfalls durch energiereiche Strahlen ausgelöst.

Es ist jedoch bekannt, daß energiereiche Strahlen einen zellschädigenden Einfluß auf Mikroorganismen ausüben können. Bereits die Bestrahlung mit nahem UV-Licht kann bei Mikroorganismen Mutationen auslösen und damit die biokatalytische Aktivität der Immobilisate erniedrigen oder zu ihrer vollständigen Unwirksamkeit führen.

3.18.1 Einfluß der Bestrahlungsdauer mit UV-Licht auf
die Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der
immobilisierten C. simplex-Zellen

Bei der Photovernetzungsreaktion des vinylierten PVA I-B1 mit UV-Licht in Gegenwart von C. simplex-Zellen zu dem Immobilisat I-B1/2-C. simplex wurde eine Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität des Immobilisates von der Bestrahlungsdauer bei der Immobilisierungsreaktion gefunden.

Es wurde untersucht, wie die enzymatische Aktivität der im Polymerisat I-B1/2 immobilisierten C. simplex-Zellen durch die Dauer der UV-Bestrahlung beeinflusst wurde (Tab. 20). Die Untersuchung erfolgte mit einem Immobilisat der Zellkonzentration 0,77 g C. simplex/g Immobilisat in einer Substratlösung aus 2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 0,5 mmol l⁻¹ Menadion und 1 % DMF.

Tab. 20: Einfluß der Dauer der UV-Bestrahlung bei der Photovernetzung auf die Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität des Immobilisates I-B1/2-C. simplex

Bestrahlungsdauer mit UV-Licht	Aktivität
a)	b)
(h)	($\mu\text{mol/g}_{\text{Imm.}} \cdot \text{h}$)
1	165
1,5	165
2	137
3,5	65
4,5	29

- a) Bestrahlt mit einer 300 W Photolampe aus 40 cm Abstand.
 b) Immobilisatmenge und Aktivitätsmessung wie in Tab. 8 angegeben.

Aus Tab. 20 geht, wie es zu erwarten war, hervor, daß sich die Aktivität der polymerfixierten Mikroorganismen mit zunehmender Bestrahlungsdauer mit UV-Licht deutlich verringert.

Bei einer längeren Bestrahlungsdauer als 1,5 Stunden bei der Photovernetzung des vinylierten PVA verlieren die immobilisierten *C. simplex*-Zellen bereits einen Teil ihrer biokatalytischen Aktivität.

Bei der in 3.3.1 beschriebenen Photovernetzung des vinylierten PVA behalten die immobilisierten *C. simplex*-Zellen auch bei längerer Bestrahlungsdauer ihre volle enzymatische Aktivität, wenn die Photovernetzungsreaktion mit sichtbarem Licht durchgeführt wird. Die Photovernetzungsreaktion mit sichtbarem Licht ist demnach der Photovernetzung mit UV-Licht vorzuziehen.

3.18.2 Aktivitätsbestimmung mit den Immobilisaten
I-B1/3-C. simplex und I-B1/4-C. simplex

Die radikalische Vernetzung des vinylierten PVA I-B1 mit $K_2S_2O_8$ und 3-(Dimethylamino)-propionitril als Initiatoren führte in Gegenwart von C. simplex-Zellen zu dem Immobilisat I-B1/3-C. simplex. Dieses Immobilisat besaß eine Zellkonzentration von 0,74 g C. simplex/g Immobilisat und zeigte nach Inkubation bei den Aktivitätsbestimmungen in $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison-Lösungen eine maximale Aktivität von $15 \text{ } \mu\text{mol/g}_{\text{Imm. h}}$. Hier betrug die Aktivitätsausbeute etwa 23 %. Sie ist damit deutlich geringer als bei den durch Photovernetzung hergestellten C. simplex-Immobilisaten I-B1/1 und I-B1/2.

Die Veränderung des vinylierten PVA durch Zugabe von N,N'-Methylen-diäcrylamid als niedermolekularen bifunktionellen Vernetzer führte nach der in Gegenwart von C. simplex-Zellen durchgeführten Vernetzungsreaktion zum Immobilisat I-B1/4-C. simplex. Das auf diese Weise hergestellte Immobilisat zeigte ebenfalls eine Aktivitätsausbeute von nur etwa 20 %. Die hier gemessene geringe Aktivität der Immobilisate I-B1/3-C. simplex und I-B1/4-C. simplex beruht wahrscheinlich auf einer teilweise Schädigung der eingeschlossenen Zellen durch die toxisch wirkenden niedermolekularen Verbindungen. Denkbar ist es aber auch, daß die auf chemische Einflüsse empfindlich reagierende Enzyminduktion bei den immobilisierten C. simplex-Zellen durch die Reagenzien verhindert wurde. Auch durch die geringe Kontaktzeit von nur wenigen Minuten, in denen die Mikroorganismen mit den niedermolekularen Reagenzien in Berührung kamen, konnte die zellschädigende Wirkung der Initiierungs- und Vernetzungskomponenten nicht verhindert werden.

Die bei diesen Vernetzungsreaktionen des vinylierten PVA verwendeten Reagenzien sind von der vernetzenden Polymerisation von Acrylamid her bekannt und werden auch zur Herstellung von Polyacrylamid-Immobilisaten verwendet.

3.19 Immobilisierung von Bacillus sphaericus durch Einschluß in die reaktiven Polymerisate

Bacillus sphaericus zeigt ebenso wie Corynebakterium simplex Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität und wird zur Steroidtransformation von Hydrocortison zu Prednisolon verwendet (37, 38).

Immobilisierte Bacillus sphaericus-Zellen wurden bisher noch nicht beschrieben.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde davon ausgegangen, daß Bacillus sphaericus nicht den Abbau des bei der Steroidumwandlung gebildeten Prednisolons katalysieren könnte (siehe 3.14), jedoch konnte diese Annahme nicht bestätigt werden.

Bacillus sphaericus-Zellen wurden in die Polymerisate I-81/1 und II-co3b eingeschlossen und ihre katalytischen Eigenschaften und ihr enzymatisches Verhalten bei aufeinanderfolgenden Reaktionsansätzen untersucht.

Die Anfangsaktivität der freien Bacillus sphaericus-Zellen betrug bei 30°C in Substratlösungen mit 0,5 mmol l⁻¹ Hydrocortison und 1 % DMF in Phosphat-Puffer (pH 6,8) 13 µmol/g_{Bakt.} h und war damit deutlich niedriger als die Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität der freien C. simplex-Zellen.

Wie es auch bei den freien C. simplex-Zellen beobachtet wurde, verminderte sich bei den freien Bacillus sphaericus-Zellen bereits nach kurzer Reaktionszeit die Aktivität bei der Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon. Dagegen zeigten die im Polymerisat I-81/1 immobilisierten Bacillus sphaericus-Zellen eine während der Steroidumsetzung gleichbleibende Aktivität von 6,5 µmol/g_{Imm.} h bzw. 13 µmol/g_{Bakt.} h (Substratlösung: 0,5 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 0,25 mmol l⁻¹ Menadion, 1 % DMF; bei 30°C).

Im Vergleich hierzu zeigten die immobilisierten *C. simplex*-Zellen eine 20 bis 30-fach höhere Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität.

Die katalytische Langzeit-Stabilität der im Polymerisat II-co3b immobilisierten *Bacillus sphaericus*-Zellen bei aufeinanderfolgenden Steroidumsetzungen wurde in Substratlösungen mit $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison und 0,2 % DMF in Phosphat-Puffer bestimmt.

Es wurden mit ein und derselben Immobilisatprobe acht aufeinanderfolgende Steroidumsetzungen durchgeführt, wobei jede Steroidumsetzung wegen der geringen Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität 3 Tage dauerte.

Bei fast allen Steroidumsetzungen wurde ein Abbau von Prednisolon beobachtet. Bei oft vollständigem Abbau der eingesetzten Hydrocortison-Menge (9,06 mg/50 ml Phosphat-Puffer) wurden daher auch nur maximal 26 % der möglichen Prednisolon-Menge in den Substratlösungen gefunden.

Hier schienen sich auch nicht die Prednisolon-abbauenden Eigenschaften der *Bacillus sphaericus*-Zellen zu verändern, wie es bei den Steroidumwandlungen mit immobilisierten *C. simplex*-Zellen in cofaktor-freien Substratlösungen beobachtet wurde (siehe 3.14).

3.20 Immobilisierung von Candida parapsilosis und
Pseudomonas putida durch Einschluß in die
reaktiven Polymerisate

Candida parapsilosis- und Pseudomonas putida-Zellen wurden in die Polymerisate I-A2/1, I-B1/1 und II-co3b eingeschlossen. Die Immobilisierungsreaktionen erfolgten in der gleichen Weise wie die Einschlußfixierung der C. simplex-Zellen, wie sie in 3.8 beschrieben wurde.

Die Zellkonzentration in den Candida parapsilosis- und Pseudomonas putida-Immobilisaten betrug bei den I-A2/1-Immobilisaten etwa 0,5 g Zellen/g Immobilisat, bei den I-B1/1-Immobilisaten 0,7 bis 0,8 g Zellen/g Immobilisat und bei den II-co3b-Immobilisaten etwa 0,40 g Zellen/g Immobilisat.

Mit den immobilisierten Candida- und Pseudomonas-Zellen wurden Untersuchungen über den mikrobiellen Abbau von Alkanen durchgeführt. Die Untersuchungen führte Prof. Dr. H. J. Rehm vom Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durch.

Die Alkanabbauprodukte wurden gaschromatographisch bestimmt und waren im wesentlichen Produkte des monoterminalen und gelegentlich auch Produkte des subterminalen Abbaus. Bei den mit den immobilisierten Mikroorganismen durchgeführten Versuchen trat nach kurzer Zeit eine Infektion durch Pseudomonas-Arten und Schimmelpilzen auf. Es war daraufhin nicht mehr festzustellen, ob die Alkanabbauprodukte von den immobilisierten Zellen oder aber durch die Fremdkeime gebildet wurden.

Eine nachträgliche Sterilisation der Immobilisate, die zur Abtötung der Fremdkeime führen sollte, war nicht möglich, da auch die eingeschlossenen Candida parapsilosis- und Pseudomonas putida-Zellen inaktiv wurden.

4. Experimenteller Teil

Herkunft der verwendeten Substanzen und Mikroorganismen:

Poly-(vinylalkohol) (PVA; Merck-Schuchardt, Molekulargewicht ca. 72 000, Hydrolyisierungsgrad 98 %)

Thioglykolsäure, 3-Mercaptopropionsäure (Merck-Schuchardt)

Acrylsäure (Ferak /Berlin)

Acrylsäuremethylester (Aldrich)

N-Vinylpyrrolidon (Fluka)

Riboflavin-5'-monophosphat Na-Salz (Fluka)

N,N'-Methylen-diäcrylamid (Merck)

Menadion (Merck)

N-Methylphenazonium-methosulfat (Fluka)

Pepton (aus Sojabohnenmehl, papainisch verdaut; Merck)

Hefeextrakt, Stärkezucker, Corn steep (Schering AG/Berlin).

Corynebakterium simplex-Trockenpulver und

Bacillus sphaericus-Trockenpulver (Schering AG/Berlin)

Pseudomonas putida- und Candida parapsilosis-Trockenpulver

(Prof. Dr. H. J. Rehm, Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster)

Geräte:

Polarographie: Polarecord E 505 und E 506 (Metrohm/Herisau)

HPLC: Chromatograph (Series 3, Perkin-Elmer)

Säule (Li-Chrosorb Diol, 5 μ , Merck)

Detektor (L 15, Perkin-Elmer)

Integrator (Sigma 10, Perkin-Elmer)

UV-Spektroskopie: Spektrometer 555 (Perkin-Elmer)

Dünnschichtchromatographie: HPTLC-Linear 28 510 (Camag/Berlin mit HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ für die Nano-DC (Merck)

Dialyse: Visking-Dialysierschläuche (Serva/Heidelberg)

Membranfilter Typ BPR 10 00 06 (Berghof)

3.20 Immobilisierung von Candida parapsilosis und
Pseudomonas putida durch Einschluß in die
reaktiven Polymerisate

Candida parapsilosis- und Pseudomonas putida-Zellen wurden in die Polymerisate I-A2/1, I-B1/1 und II-co3b eingeschlossen. Die Immobilisierungsreaktionen erfolgten in der gleichen Weise wie die Einschlußfixierung der C. simplex-Zellen, wie sie in 3.8 beschrieben wurde.

Die Zellkonzentration in den Candida parapsilosis- und Pseudomonas putida-Immobilisaten betrug bei den I-A2/1-Immobilisaten etwa 0,5 g Zellen/g Immobilisat, bei den I-B1/1-Immobilisaten 0,7 bis 0,8 g Zellen/g Immobilisat und bei den II-co3b-Immobilisaten etwa 0,40 g Zellen/g Immobilisat.

Mit den immobilisierten Candida- und Pseudomonas-Zellen wurden Untersuchungen über den mikrobiellen Abbau von Alkanen durchgeführt. Die Untersuchungen führte Prof. Dr. H. J. Rehm vom Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durch.

Die Alkanabbauprodukte wurden gaschromatographisch bestimmt und waren im wesentlichen Produkte des monoterminalen und gelegentlich auch Produkte des subterminalen Abbaus. Bei den mit den immobilisierten Mikroorganismen durchgeführten Versuchen trat nach kurzer Zeit eine Infektion durch Pseudomonas-Arten und Schimmelpilzen auf. Es war daraufhin nicht mehr festzustellen, ob die Alkanabbauprodukte von den immobilisierten Zellen oder aber durch die Fremdkeime gebildet wurden.

Eine nachträgliche Sterilisation der Immobilisate, die zur Abtötung der Fremdkeime führen sollte; war nicht möglich, da auch die eingeschlossenen Candida parapsilosis- und Pseudomonas putida-Zellen inaktiv wurden.

4. Experimenteller Teil

Herkunft der verwendeten Substanzen und Mikroorganismen:

Poly-(vinylalkohol) (PVA; Merck-Schuchardt, Molekulargewicht ca. 72 000, Hydrolyisierungsgrad 98 %)

Thioglykolsäure, 3-Mercaptopropionsäure (Merck-Schuchardt)

Acrylsäure (F&E /Berlin)

Acrylsäuremethylester (Aldrich)

N-Vinylpyrrolidon (Fluka)

Riboflavin-5'-monophosphat Na-Salz (Fluka)

N,N'-Methylen diacrylamid (Merck)

Menadion (Merck)

N-Methylphenazonium-methosulfat (Fluka)

Pepton (aus Sojabohnenmehl, papainisch verdaut; Merck)

Hefeextrakt, Stärkezucker, Corn steep (Schering AG/Berlin).

Corynebakterium simplex-Trockenpulver und

Bacillus sphaericus-Trockenpulver (Schering AG/Berlin)

Pseudomonas putida- und Candida parapsilosis-Trockenpulver

(Prof. Dr. H. J. Rehm, Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster)

Geräte:

Polarographie: Polarecord E 505 und E 506 (Metrohm/Herisau)

HPLC: Chromatograph (Series 3, Perkin-Elmer)

Säule (Li-Chrosorb Diol, 5 μ , Merck)

Detektor (L 15, Perkin-Elmer)

Integrator (Sigma 10, Perkin-Elmer)

UV-Spektroskopie: Spektrometer 555 (Perkin-Elmer)

Dünnschichtchromatographie: HPTLC-Linear 28 510 (Camag/Berlin mit HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ für die Nano-DC (Merck)

Dialyse: Visking-Dialysierschläuche (Serva/Heidelberg)

Membranfilter Typ BPR 10 00 06 (Berghof)

Siebgerät: Fritsch-Analysette (A. Fritsch OHG/Idar-Oberstein)

Homogenisator: Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, IKA-Werk/Staufen)

Gefriertrocknungsanlage: CT 2 (Leybold-Heraeus)

UV-Photolampe: Ultra-Vitalux, 300 W (Osram)

Wasserbad-Rotationsschüttler (Braun)

Inkubationsschüttler (Lab-Therm, Typ 684 202, Braun-Melsungen).

4.1 Darstellung reaktiver Poly-(vinylalkohol)-Derivate

4.1.1 Umsetzung von PVA mit Thioglykolsäure zu I-A1 und 3-Mercaptopropionsäure zu I-A2 (62)

11 g PVA (0,25 mol Hydroxy-Gruppen) wurden in 125 ml 0,33 N⁻ HCl bei 80°C gelöst. Unter N₂-Atmosphäre wurden 8,8 g (0,08 mol) 3-Mercaptopropionsäure langsam zum gelösten PVA gegeben.

Die Lösung wurde 3 h bei 90°C und weitere 12 h bei Raumtemperatur unter Ausschluß von Luft-Sauerstoff gerührt. Die Polymerenlösung wurde nach Neutralisation mit verdünnter NaOH unter N₂-Atmosphäre gegen Wasser dialysiert.

Nach Auffüllen der Polymerenlösung mit Wasser auf 250 ml wurde soviel Na₂HPO₄·2H₂O und KH₂PO₄ zugesetzt, daß die Konzentration an beiden Phosphaten je 25 mmol l⁻¹ war. Der Thiolgruppengehalt im PVA-Derivat wurde mit Ellman's-Reagenz, 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), ermittelt. Nach zusätzlicher Vernetzung des oxidativ vernetzten Polymeren mit Terephthalaldehyd in salzsaurer Lösung wurde das Polymere mit 1,4-Dithiotreit reduziert und anschließend mit DTNB umgesetzt.

Die Thiolgruppen-Bestimmung erfolgte durch Messung der Absorption bei 412 nm und ergab einen Thiolgruppen-Gehalt von 0,13 mÄq/g.

Die Veresterung von PVA mit Thioglykolsäure erfolgte analog nach der beschriebenen Methode.

4.1.2 Umsetzung von PVA mit Acrylsäure zu I-B

22 g PVA (0,5 mol Hydroxy-Gruppen) wurden in 250 ml 1 N HCl bei 80°C gelöst. Unter N₂-Atmosphäre wurde Acrylsäure in unterschiedlichen molaren Verhältnissen (1 : 1 bis 1 : 4) der Polymerenlösung zugesetzt. Die Lösung wurde 3 h bei 90°C und danach bei Raumtemperatur weitere 24 h gerührt. Die Polymerlösung wurde nach Neutralisation mit verdünnter NaOH gegen Wasser dialysiert und danach lyophilisiert. Die quantitative Analyse des Vinylierungsgrades erfolgte in Anlehnung an die Methode der Jodzahl-Bestimmung: 400 mg des vinylierten PVA wurden in 15 ml Wasser gelöst und mit 1 ml wäßriger Bromlösung (aus 1 ml Brom und 3 g NaBr in 25 ml Wasser) unter Schütteln bei 30°C im lichtgeschützten Reaktionsgefäß 2 h umgesetzt. 10 ml der Analysenlösung wurden mit 5 ml einer 10 proz. KJ-Lösung versetzt und das entstandene Jod mit 0,01 N Natriumthiosulfat-Lösung unter Zusatz von Stärke titriert. Die Analysenergebnisse sind in Tab. 1 wiedergegeben. Eine Blindwert-Bestimmung erfolgte mit nicht derivatisiertem PVA.

4.1.3 Vernetzung von PVA mit Terephthalaldehyd zu I-C1

2,2 g PVA (0,05 mol Hydroxy-Gruppen) wurden in 100 ml Wasser bei 80°C gelöst und nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 0,33 g (2,5 mmol) Terephthalaldehyd versetzt. Der pH-Wert der Polymerenlösung wurde durch Zugabe von konz. HCl auf pH 1 eingestellt. Die Vernetzungsreaktion war nach etwa 1 h beendet.

Die Vernetzung von PVA mit Poly-(acrolein)-Bisulfit-Additionsprodukt (7,7 mÄq/g) zu I-C2 erfolgte in gleicher Weise mit 0,25 g Poly-(acrolein)-Bisulfit-Additionsprodukt/g PVA.

4.1.4 Vernetzung von PVA mit p-Benzocninin zu I-D (82)

10 ml einer 10 proz. Lösung von PVA (23 mmol Hydroxy-Gruppen) in Phosphat-Puffer wurden mit 0,25 g (2,3 mmol) Hydrochinon und einer äquivalenten Menge $K_2Cr_2O_7$ in Wasser versetzt.

4.1.5 Darstellung von Zimtsäurepolyvinylester (I-E) (84)

1,3 g PVA (29,5 mmol Hydroxy-Gruppen) wurden bei 80°C in Wasser gelöst und die Polymerenlösung nach Abkühlen mit NaOH versetzt. Die Konzentration an NaOH betrug am Ende 5 mmol l⁻¹. Zu der auf 4°C abgekühlten Lösung wurden 4,92 g (29,5 mmol) Zimtsäurechlorid, welches in 100 ml einer auf 4°C abgekühlten Mischung aus Ethylmethyleketon/Benzol(9 : 1) gelöst war, langsam zugetropft. Nach 24 stündigem Rühren bei 4°C wurde die Lösung mit verd. HCl neutralisiert und die organischen Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Das in der wäßrigen Phase ausfallende polymere Reaktionsprodukt wurde 3 Tage mit Wasser/Ethanol extrahiert.

Ausbeute: 4,0 g

Elementaranalyse:

$C_{11}H_{10}O_2$	% C	% H
ber.:	75,84	5,79
gef.:	74,79	5,84

IR-Spektrum (KBr):

3065, 3030 cm⁻¹ (Aryl-H und -C=CH; 1495 cm⁻¹ (Aromat), 765 cm⁻¹ (Substitutionsmuster des Benzolringes, monosubst.).

4.2 Darstellung reaktiver Poly-(acrylsäurehydrazone) und Acrylsäurehydrazon-N-Vinylpyrrolidon-Copolymerisate

4.2.1 Polymerisation von Acrylsäuremethylester zu II (86)

25 ml (0,277 mol) entstabilisierter Acrylsäuremethylester in 30 ml Wasser wurden mit 5 ml einer 10 proz. wäßrigen Lösung von Natriumdodecylsulfat und mit 1 ml einer 0,9 proz. wäßrigen Lösung von $K_2S_2O_8$ versetzt und unter Rühren und N_2 -Atmosphäre am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Die Polymerisation began nach 5 bis 10 min und war nach etwa 15 min beendet. Nach 1 h wurden flüchtige organische Anteile der Reaktionslösung mit Wasserdampf abgetrieben, das Polymer mit Methanol koaguliert und abfiltriert. Das Polymer wurde emulgatorfrei gewaschen und bei $100^{\circ}C$ getrocknet.

Elementaranalytische Zusammensetzung siehe Tab. 21.

4.2.2 Copolymerisation von Acrylsäuremethylester und N-Vinylpyrrolidon zu II-co1

25 ml (0,277 mol) entstabilisierter Acrylsäuremethylester wurde in 30 ml Wasser mit 29,46 ml (0,277) frisch destilliertem N-Vinylpyrrolidon und 5 ml einer 10 proz. Lösung von Natriumdodecylsulfat in Wasser sowie mit 1 ml einer 0,9 proz. wäßrigen Lösung von $K_2S_2O_8$ versetzt. Die Reaktionsdurchführung und die Aufarbeitung des Copolymeren erfolgten wie bei der Herstellung von Poly-(acrylsäuremethylester) (4.2.1) angegeben.

Die Copolymere II-co2 und II-co3 wurden entsprechend hergestellt.

Die berechneten und elementaranalytisch gefundenen Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoff-Werte der Polymerisate II und II-co sind in Tab. 21 zusammengefaßt.

Tab. 21: Analysenwerte von Poly-(acrylsäuremethylester) II und den Acrylsäuremethylester-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren II-co



Polymerisat-Nr.	m	n		% C	% H	% N
II	-	1	ber.:	55,81	7,02	-
			gef.:	55,52	7,15	-
II-co1	0,435	0,565		60,31 59,15	7,59 7,66	6,28 6,29
II-co2	0,245	0,755		57,99 57,33	8,12 7,47	3,69 3,71
II-co3	0,105	0,895		56,42 56,40	8,11 7,15	1,64 1,62

4.2.3 Umsetzung von Poly-(acrylsäuremethylester) II und der Acrylsäuremethylester-N-Vinylpyrrolidon-Copolymerisate II-co mit Hydrazinhydrat zu IIa bzw. II-co/a (93)

3 g Poly-(acrylsäuremethylester) wurden in möglichst fein verteilter Form mit 30 g Hydrazinhydrat bei 100°C unter Rühren 2,5 h umgesetzt.

Das polymere Reaktionsprodukt wurde anschließend in 500 ml Methanol, das 1 ml Eisessig enthielt, ausgefällt. Das Polymer wurde in Wasser gelöst und gegen Wasser dialysiert.

Die Umsetzung der Acrylsäuremethylester-N-Vinylpyrrolidon-Copolymerisate mit Hydrazinhydrat erfolgte in Pyridin. 3 g des in Pyridin gelösten Copolymerisates (5 proz. Lösung) wurden mit 30 g Hydrazinhydrat umgesetzt. Die Reaktionsdurchführung und die Aufarbeitung der polymeren Produkte erfolgte wie oben angegeben.

Die berechneten und gefundenen Analysenwerte der polymeren Säurehydrazide sind in Tab. 22 wiedergegeben.

Tab. 22: Analysenwerte der polymeren Säurehydrazide



Polymerisat-Nr.	m	n	o		% C	% H	% N
IIa	-	0,1	0,9	ber.: 40,27 gef.: 41,39	7,85 6,81	27,27 27,86	
II-co1a	0,435	0,39	0,175		56,92 55,85	7,67 7,37	11,10 11,04
II-co2a	0,245	-	0,755		44,96 45,84	7,49 7,01	19,47 19,63
II-co3a	0,100	0,28	0,62		44,32 42,03	7,71 6,99	24,29 25,85

4.3 Immobilisierungsreaktionen

4.3.1 Einschließung der Mikroorganismen in die I-A-Polymerisate

In 40 ml der Polymerenlösung (siehe 4.1.1) wurden 1,92 g C. simplex-Trockenpulver suspendiert und die Mischung mit einem schnell drehenden Rührer (Ultra Turrax) weitgehend homogenisiert.

Die Suspension wurde in einer Glasschale (Durchmesser 20 cm) gleichmäßig ausgestrichen.

Die Vernetzungsreaktion des thiolierten PVA führte bei 20°C in 8 Tagen durch oxidative Vernetzung durch den Sauerstoff der Luft zu einer über Disulfid-Brücken vernetzten unlöslichen Folie. Nach der Vernetzungsreaktion wurde das Immobilisat mit 50 mM Phosphat-Puffer (pH 6,8) bei 4°C 24 h intensiv gewaschen und anschließend lyophilisiert. Das auf 5 x 5 mm Plättchen zerschnittenen Immobilisat (Dicke ca. 0,2 mm) wurde bis zur Steroidumwandlung als Lyophilisat bei -20°C gelagert. Bei dieser Lagerbedingung wurde innerhalb von 6 Monaten kein Aktivitätsabfall festgestellt.

4.3.2 Einschließung der Mikroorganismen in die I-B-Polymerisate

10 ml einer 8 proz. Lösung des vinylierten PVA in Phosphat-Puffer ($25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und $25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$) wurden üblicherweise mit einer Suspension von 6 g C. simplex-Trockenpulver in 25 ml Phosphat-Puffer vermengt. Der Mischung wurden die niedermolekularen Reagenzien bzw. der Photosensibilisator zugesetzt.

Photovernetzung:

Die Polymer-Bakterien-Mischung wurde mit 80 mg Riboflavin-5'-monophosphat Na-Salz (10 Gew. %) versetzt und die Mischung gleichmäßig auf einer 600 cm^2 großen Glasplatte ausgestrichen. Die Bestrahlung mit sichtbarem Licht erfolgte

mit einer 250 Watt Lampe aus 20 cm Abstand. Während der 3-stündigen Vernetzungsreaktion wurde die Temperatur im Strahlengang mittels eines auf die Lampe gerichteten Gebläses auf 25°C begrenzt.

Die Bestrahlung mit dem UV-Licht einer 300 Watt-Photolampe (Osram, Vitalux) erfolgte aus 40 cm Abstand. Die Temperatur im Strahlengang betrug hier ebenfalls maximal 25°C.

Die als Folien anfallenden Immobilisate wurden 24 h bei 30°C unter Schütteln in Phosphat-Puffer gewaschen und danach lyophilisiert. Die Folien (Dicke ca. 0,1 mm) wurden auf Bruchstücke von 1 bis 9 mm² Fläche zerrieben und bis zur Steroidumwandlung als Lyophilisat bei -25°C aufbewahrt. Bei dieser Lagerbedingung wurde innerhalb von 6 Monaten kein Aktivitätsverlust festgestellt.

Vernetzung mit niedermolekularen Reagenzien:

Die Polymer-Bakterien-Mischung wurde mit 100 mg K₂S₂O₈ und 200 µl 3-(Dimethylamino)-propionitril versetzt.

Nach Zugabe der niedermolekularen Reagenzien trat innerhalb von 2 min die Gelbildung ein. Das Immobilisat wurde 24 h in Phosphat-Puffer gewaschen und danach lyophilisiert. Das Immobilisat wurde zermahlen und auf die Korngröße 0,5 - 1,0 mm ausgesiebt.

Die Veränderung des polymeren Produktes mittels eines niedermolekularen bifunktionellen Vernetzers erfolgte durch Zugabe einer äquivalenten Menge N,N'-Methylen-diacrylamid.

4.3.3 Einschließung der Mikroorganismen in die Polymerisate I-C, I-D und I-E

Die Polymer-Bakterien-Mischungen der Polymerisate I-C1, I-C2 und I-D (2,0 g C. simplex-Zellen/g Polymerisat) wurden nach weitgehendem Homogenisieren bei 20 000 U/min (Ultra-Turrax) mit den niedermolekularen Vernetzerkomponenten versetzt. Nach der Vernetzungsreaktion wurden die Immobilisate

24 h mit Phosphat-Puffer gewaschen und anschließend lyophilisiert. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten mit Immobilisaten der Korngröße 0,2 - 1,0 mm.

Die Immobilisierung von Mikroorganismen durch Photovernetzung in dem Polymerisat I-E wurde nach den Angaben in 4.3.2 (Photovernetzung mit UV-Licht) durchgeführt.

4.3.4 Einschließung der Mikroorganismen in Poly-(acrylsäurehydrazid) IIa und in die Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymerisate II-co/a

100 ml einer 1 proz. Lösung von Poly-(acrylsäurehydrazid) (9,9 mÄq/g) in Phosphat-Puffer wurden üblicherweise mit 2,0 g C. simplex-Trockenpulver vermengt. Die Polymer-Bakterien-Mischung wurde mit einem schnell drehenden Rührer (Ultra-Turrax) bei 20 000 U/min weitgehend homogenisiert und mit 1,33 g (9,95 mmol) Terephthalaldehyd im Überschuß unter Rühren versetzt.

Die Vernetzungsreaktion war nach etwa 15 min beendet.

Nach 30 min wurden die Immobilisatpartikel abfiltriert und mit Phosphat-Puffer 24 h intensiv gewaschen.

Die unregelmäßig geformten Partikel wurden in die Kornfraktionen 0,05 - 0,1 mm, 0,1 - 0,2 mm und 0,2 - 0,5 mm Maschenweite feucht ausgesiebt und danach lyophilisiert (Immobilisat: IIb).

Die Herstellung der Immobilisate IIc, IId und IIe erfolgte in der gleichen Weise mit den in Tab. 5 angegebenen Konzentrationen der niedermolekularen und polymeren Vernetzungsreagenzien.

Die Einschließung der Mikroorganismen in die Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymerisate II-co/a und die Aufarbeitung der Immobilisate wurden entsprechend durchgeführt. Die Vernetzungsreaktionen erfolgten in allen Fällen mit 1,3 g Terephthalaldehyd/g Copolymerisat im Überschuß.

Diese Immobilisate zeigten im feuchten Zustand eine weiche Gelstruktur und wurden durch ein Sieb der Maschenweite 0,8 mm gedrückt, um kleinere Partikel zu erhalten.

4.4 Substratlösung

Hydrocortison und Menadion wurden in N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst und mit Phosphat-Puffer ($25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und $25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$) die gewünschte Substratkonzentration eingestellt.

Die Substratlösung für die Steroidumsetzung bestand üblicherweise aus $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison, $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ Menadion und 1 % (v/v) DMF. Eine von dieser Substratlösung abweichende Zusammensetzung ist im Text an entsprechender Stelle angegeben.

4.5 Inkubation der C. simplex-Immobilisate

100 mg des lyophilisierten C. simplex-Immobilisates wurden vor der Steroidumwandlungsreaktion in 50 ml einer 0,2 - 1,0 mM Hydrocortison-Lösung (in Phosphat-Puffer, 1 % DMF) im thermostatisierten Rotationsschüttler bei 30°C 24 h unter aeroben Bedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Immobilisat mit Phosphat-Puffer gewaschen.

4.6 Aktivitätsbestimmung der C. simplex- und Bacillus sphaericus-Immobilisate und der freien Mikroorganismen

Die Steroidumwandlung erfolgte mit 100 mg des inkubierten C. simplex- bzw. Bacillus sphaericus-Immobilisates in 50 ml bis 100 ml einer auf 30°C thermostatisierten Substratlösung im Rotationsschüttler bei 160 U/min. Alle Steroidumwandlungen erfolgten unter nicht sterilen Reaktionsbedingungen.

Der zeitliche Verlauf der Steroidumwandlungsreaktion wurde hauptsächlich mittels der Differential-Pulspolarographie diskontinuierlich in einstündigen Intervallen verfolgt. Als weitere Analysenmethoden eigneten sich die Hochdruck-flüssigkeitschromatographie (HPLC), die Dünnschichtchromatographie (DC) und die UV-Spektroskopie.

Polarographische Analyse:

Die Polarographie als elektrochemisches Analysenverfahren erlaubte in schneller und reproduzierbarer Weise die genaue quantitative Analyse des Steroid-Produktes und damit eine Aussage über den kinetischen Verlauf der Steroidumwandlungsreaktion.

Bei der Polarographie wird eine mit der Zeit monoton zunehmende Gleichspannung an die Meßzelle gelegt (118). Es wird dann der sich einstellende Diffusionsgrenzstrom i_d gemessen und als Polarogramm aufgezeichnet. Werden bei hinreichender Spannung alle an die Elektrode gelangenden Depolarisator-Teilchen elektrolysiert, dann stellt sich zwischen Elektrodenoberfläche und Lösung ein maximales Konzentrationsgefälle ein. Dieses bestimmt die Diffusionsgeschwindigkeit des Depolarisators und damit die Stärke des Diffusionsstromes i_d .

Die Ilkovič-Gleichung (Gl. 11) für den Diffusionsgrenzstrom i_d lautet:

$$(11) \quad i_d = 706 \cdot z \cdot c \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6}$$

z: Zahl der bei der Durchtrittsreaktion
Depolarisator-Elektrode ausgetauschten
Elektronen

c: Konzentration des Depolarisators

D: Diffusionskoeffizient

m: Massenstrom des aus der Tropfkapillare
ausfließenden Hg-Tropfens

t: Zeit

Für Substanzen mit langsamen Depolarisator-Durchtrittsreaktionen, wie es für die meisten organischen Substanzen zutrifft, ist die Differential-Pulspolarographie (DPP) eine leistungsfähigere Methode. Bei der DPP wird pro Quecksilbertropfen ein einzelner, kurzer Rechteck-Spannungspuls an die Meßzelle angelegt. Der Strom der Arbeitselektrode wird unmittelbar vor dem Pulsanstieg und - an demselben Tropfen - am Schluß des Pulses während je 20 ms integriert. Die Differenz der beiden Stromintegrale, die weitgehend frei von störenden Einflüssen wie z.B. dem Ladestrom, Wechselspannungsanteilen usw. ist, wird als Funktion der Spannung registriert.

Die Meßzelle enthielt als Arbeitselektrode die tropfende Quecksilberelektrode (DME), die Bezugs- und die Hilfelektrode (beide $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{LiCl}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

Als Leitelektrolyt diente Phosphat-Puffer ($25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und $25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$), dem eventuell NH_4Cl in $0,1 \text{ M}$ - Konzentration zugesetzt wurde.

Von den Reaktionslösungen, die $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ Hydrocortison als Anfangskonzentration enthielten, wurden $500 \mu\text{l}$ entnommen und mit 10 ml des Leitelektrolyten versetzt.

Die Steroidgesamtkonzentration bei den polarographischen Analysen betrug dementsprechend $9,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

Die quantitative Bestimmung des Depolarisators erfolgte durch Eichung mit einer Lösung bekannter Prednisolon-Hydrocortison-Konzentration. Durch Vergleich der Stromwerte konnte der unbekannte Prednisolon-Gehalt in den Analysen bestimmt werden.

In Abb. 35 ist der zeitliche Verlauf einer Steroidumwandlungsreaktion durch eine differential-pulspolarographische Analyse abgebildet.

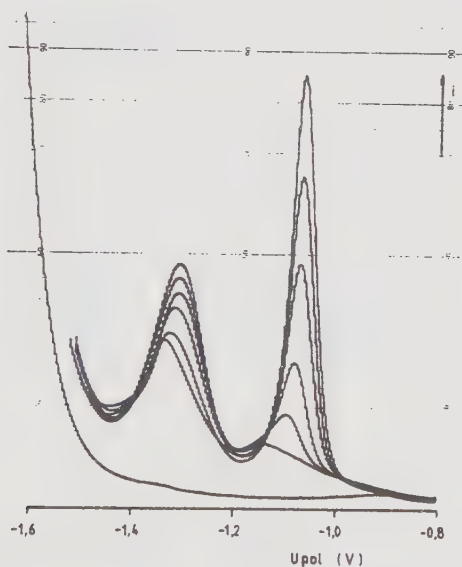
Hier ist der in Abhängigkeit der Konzentration zwischen $-1,06 \text{ V}$ und $-1,10 \text{ V}$ erscheinende Peak dem Reaktionsprodukt Prednisolon und der zwischen $-1,34 \text{ V}$ und $-1,34 \text{ V}$ erscheinende Peak dem Substrat Hydrocortison zuzuordnen.

Die Peakhöhen des Polarogramms sind den Konzentrationen der

Depolarisatoren proportional.

Der Verlauf der untersten Kurve wird durch den Leitelektrolyten charakterisiert.

Abb. 35: Differential-pulspolarographische Analyse der Steroidumwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon



Depolarisator: Hydrocortison und Prednisolon
 Konzentration: Steroid-Gesamtkonzentration max.
 $9,524 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$

Elektrode: DME

Referenzelektrode: $\text{Ag/AgCl/LiCl/C}_2\text{H}_5\text{OH}$

Leitelektrolyt: $25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$.

Analyse durch HPLC:

Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufes der Steroidumwandlung mittels HPLC wurden 1 bis 2 ml der Reaktionslösung eingetrocknet und der Rückstand in der gleichen Menge Methanol p.A. aufgenommen.

Der Analyse wurde 4-Nitro- β -phenylethanol als innerer Standard zugesetzt.

Die HPLC-Analysen wurden mit Liquid-Chromatograph Series 3 (Perkin-Elmer) mit einer 15 cm x 4,6 mm Säule durchgeführt. Die Säule wurde nach der Viskositätsmethode mit LiChrosorb Diol (5 μ) gefüllt.

Die Analysenproben wurden mit einem automatischen Probengeber aufgegeben und mit dem Detektor L 15 (Perkin-Elmer) bei 254 nm detektiert. Die Auswertung erfolgte mit Chromatography Data Station Sigma 10 (Perkin-Elmer).

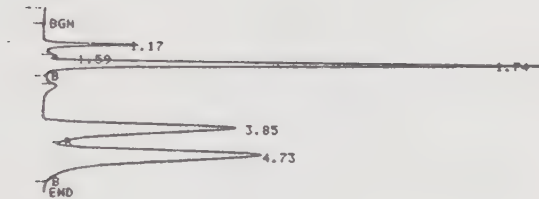
Als Eluiermittel zeigte eine Lösung aus 60 % Hexan, 30 % Chloroform und 10 % Propanol gute Trenneigenschaften. Die Dauer einer Analyse betrug bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 2 ml/min und einem Druck von 60 bar 6 min.

In Abb. 36 ist die Trennung der Komponenten nach der HPLC-Methode dargestellt. Die Retentionszeit für Prednisolon betrug unter den Bedingungen 4,73 min und für Hydrocortison 3,85 min. Die bei einer Retentionszeit von 1,73 min erscheinende Substanz ist dem 4-Nitro- β -phenylethanol zuzuordnen.

Analyse durch DC:

Eine Abschätzung der Steroidumwandlungsgeschwindigkeit konnte auch durch eine dünnschichtchromatographische Analyse erfolgen. Als Laufmittel zeigte Cyclohexan/Essigsäureethylester im Verhältnis 1 : 4 gute Trenneigenschaften. Die Substrat- und Produktkonzentration wurde im Vergleich zu Standardsubstanzen geschätzt.

Abb. 36 Bestimmung der Steroidumwandlung durch HPLC



INST 3 METH 6 FILE 8

RUN 7 BEIER CORTISONE 12 : 33.7 6 / 2 / 88

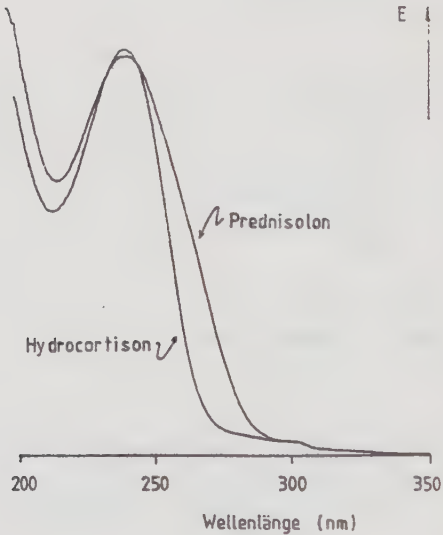
SENSITIVITIES 300 50

TIME	AREA	BC	RRT	RF	C	NAME
1.17	0.1530	T	0.117	1.000	4.0887	!
1.59	0.0236	T	0.159	1.000	0.6310	!
1.74	1.1277		0.174	1.000	30.1297	!
3.85	1.0889		0.385	1.000	26.9547	!
4.73	1.4296		0.473	1.000	38.1959	!

Analyse durch UV-Spektroskopie:

Eine Methode zur kontinuierlichen Verfolgung des zeitlichen Verlaufes der Steroidumwandlung wurde in der Bestimmung der UV-Absorption von Substrat und Produkt gefunden. Die Absorptionsmaxima für Hydrocortison und Prednisolon lagen für beide Substanzen bei 242 nm. Die unterschiedliche Steigung der Absorptionsbanden von Hydrocortison und Prednisolon (Abb. 37) erlaubten jedoch durch Messung der Gesamt-Absorption bei zwei verschiedenen Wellenlängen die rechnerische Auftrennung in die Konzentrationen der beiden Verbindungen.

Abb. 37: UV-Spektrum von Hydrocortison und Prednisolon



Die optische Messung der Extinktion E der Reaktionslösung erfolgte bei 280 nm (E_1) und bei 264 nm (E_2). Mit den bekannten Extinktionskoeffizienten für Hydrocortison (ϵ) und Prednisolon (ϵ') bei den beiden Wellenlängen konnte die aktuelle Prednisolon-Konzentration aus den Gl. (12) und Gl. (13) bestimmt werden:

$$(12) \quad E_1 = \epsilon_1 [H] + \epsilon'_1 [P] \quad \text{und}$$

$$E_2 = \epsilon_2 [H] + \epsilon'_2 [P]$$

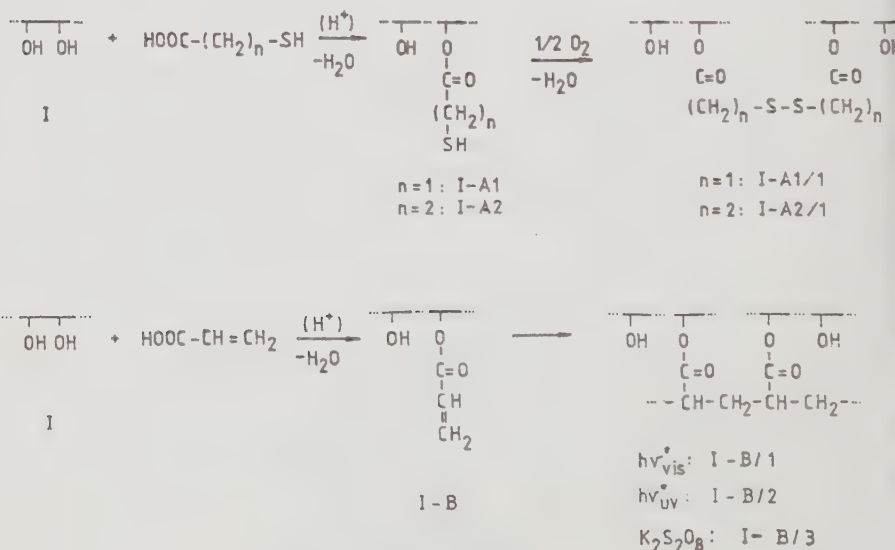
Durch Umformen erhält man:

$$(13) \quad P = \frac{E_1 \cdot \epsilon_2 - E_2 \cdot \epsilon_1}{\epsilon_2 \cdot \epsilon'_1 - \epsilon_1 \cdot \epsilon'_2}$$

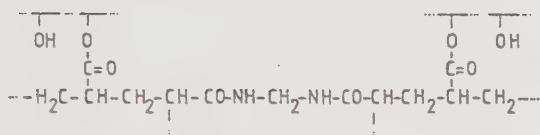
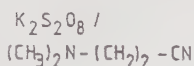
- [H] : Hydrocortison-Konzentration
- [P] : Prednisolon-Konzentration
- E_1 : Extinktion der Reaktionslösung
bei 280 nm
- E_2 : Extinktion der Reaktionslösung
bei 264 nm
- ϵ_1 : Extinktionskoeffizient von
Hydrocortison bei 280 nm
- ϵ_2 : Extinktionskoeffizient von
Hydrocortison bei 264 nm
- ϵ_1 : Extinktionskoeffizient von
Prednisolon bei 280 nm
- ϵ_2 : Extinktionskoeffizient von
Prednisolon bei 264 nm

Die UV-spektroskopische Methode wurde durch aus dem Immobilisat ausgewaschene geringe Mengen an Mikroorganismen empfindlich gestört und war auch nicht mehr anwendbar, wenn Menadion als Cofaktor der Substratlösung zugesetzt wurde.

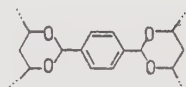
Die folgende Übersicht gibt schematisch einen Überblick über die in dieser Arbeit beschriebenen Polymerisate:



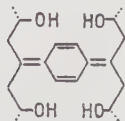
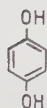
* In Gegenwart von Riboflavin-
5'-monophosphat Na-Salz



I-B/4

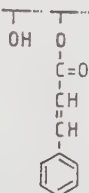
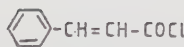
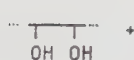


I-C1



I

I-D



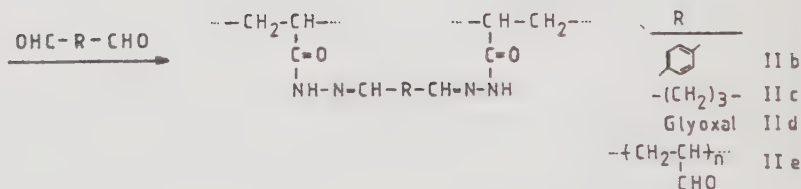
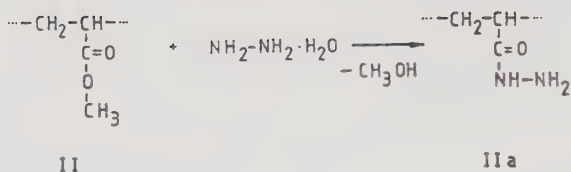
I

I-E



Über Truxinsäure- und Truxillsäure-Gruppen
vernetzte Reaktionsprodukte: I-E1

* In Gegenwart von Michler's-Keton



Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymerisate
vernetzt mit Terephthalaldehyd: II-co/b

Zur Charakterisierung der Polymerisate wurden die funktionellen Gruppen IR-spektroskopisch nachgewiesen und ihr Gehalt elementaranalytisch, titrimetrisch oder UV-spektroskopisch bestimmt.

Die Immobilisierung der Mikroorganismen erfolgte nach der Einschlußmethode und führte zu unlöslichen Immobilisatprodukten in Folien- und Partikelform.

Die Eignung der synthetisierten Polymerisate zur Immobilisierung von ganzen mikrobiellen Zellen wurde hauptsächlich mit *Corynebakterium simplex* untersucht. Daneben wurden auch *Bacillus sphaericus*-, *Pseudomonas putida*- und *Candida parapsilosis*-Zellen in die Polymerisate eingeschlossen.

Die in die Polymerisate I-C, I-D und I-E eingeschlossenen Zellen verloren aufgrund von zellphysiologisch nicht verträglichen Immobilisierungsbedingungen ihre enzymatische Aktivität. Die Polymerisate IIc bis IIe zeigten nur eine geringe mechanische Stabilität. Hingegen behielten die in die Polymerisate I-A, I-B, IIb und II-co/b eingeschlossenen Zellen ihre biokatalytische Aktivität und die Immobilisate entstanden als mechanisch stabile Produkte. Mit diesen Immobilisaten wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt.

Die Zellkonzentration in den Immobilisaten ließ sich durch gravimetrische Messung und durch elementaranalytische Bestimmung des Stickstoff-Gehaltes der Immobilisate bestimmen. Die optimalen Zellkonzentrationen in den Immobilisaten variierten in Abhängigkeit zur Polymerstruktur zwischen 0,26 und 0,79 g C. simplex-Zellen/g Immobilisat und wurden bei einem Gewichtsverhältnis von C. simplex-Zellen/ Polymerisat von 1,5 : 1 bis 7,5 : 1 erhalten (Tab. 7 - 10, S. 81 - 84).

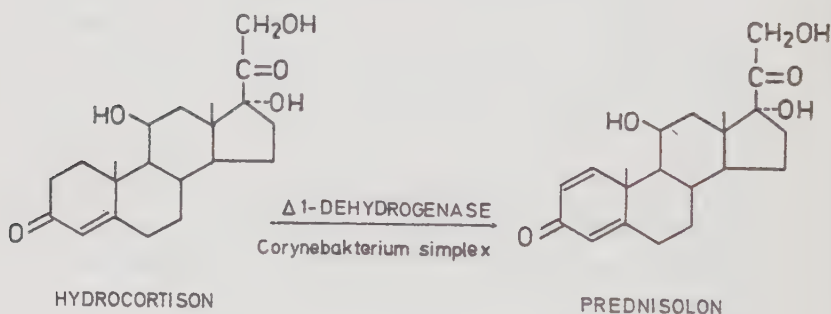
Bei der Immobilisierungsreaktion wurden in Abhängigkeit zur polymeren Matrix und der bei der Immobilisierung verwendeten Zellmenge bis zu 90 % der Zellen in den Polymerisaten eingeschlossen. Besonders gute Eigenschaften bei der Einschließung der mikrobiellen Zellen zeigten die Polymerisate auf der Basis von PVA.

Beispielsweise zeigte das durch Photoreaktion vernetzte Immobilisat aus vinyliertem PVA I-B noch bei einem Über 80 proz. Gewichtsverhältnis an Mikroorganismen mechanisch stabile Eigenschaften.

Die relativ geringere Fähigkeit des Poly-(acrylsäurehydrazids) IIb zur Einschließung von Zellen konnte durch die Verwendung von Acrylsäurehydrazid-N-Vinylpyrrolidon-Copolymeren II-co/b deutlich verbessert werden.

Die Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase (E.C. 1.3.99.4) der Corynebakterium simplex- und Bacillus sphaericus-Zellen katalysiert die Dehydrierung von Hydrocortison (3,20-Dioxo-

11 β ,17,21-trihydroxy-4-pregnen) zu dem antiphlogistisch wirksameren Prednisolon (3,20-Dioxo-11 β ,17,21-trihydroxy-1,4-pregnadien):



Der zeitliche Verlauf der Steroidumwandlung wurde hauptsächlich durch Differential-Pulspolarographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) verfolgt.

Vor den Steroidumwandlungen wurden die Corynebakterium simplex-Immobilisate in 0,2 - 1,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison in Phosphat-Puffer (0,25 mmol l⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O und 0,25 mmol l⁻¹ KH₂PO₄, pH 6,8) 24 Stunden inkubiert.

Die Inkubation bewirkte bei den immobilisierten C. simplex-Zellen eine Enzyminduktion. Die optimale Induktorkonzentration (Abb. 6, S. 69) und die günstigste Inkubationsdauer (Abb. 7, S. 70) wurden bestimmt.

Die enzymatische Aktivität der inkubierten C. simplex-Immobilisate wurde mit der Aktivität von nicht-inkubierten Immobilisaten und der der freien Zellen verglichen (Abb. 8 - 10, S. 72 - 74).

Hier zeigte sich, daß die immobilisierten C. simplex-Zellen nach der Inkubation eine 2 - 3 mal höhere enzymatische Aktivität

aufwiesen, als das zur Immobilisierung verwendete *C. simplex*-Trockenpulver. Im Vergleich zu nicht inkubierten *C. simplex*-Immobilisaten zeigten die inkubierten Immobilisatproben eine bis zu 20-fach höhere biokatalytische Aktivität (Tab. 6, S. 76).

Durch Variation der die biokatalytische Aktivität beeinflussenden Faktoren, wie der Substrat-, der Cofaktor- und der Lösungsmittelkonzentration sowie der Reaktionstemperatur und des pH-Wertes der Substratlösung wurden Optimierungsmöglichkeiten bei der Steroidumwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon aufgezeigt. Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der *C. simplex*-Immobilisate von der Rotationsgeschwindigkeit des Inkubationsschüttlers (Abb. 12, S. 94) und der Immobilisat-Partikelgröße (Tab. 12, S. 89) wurde ebenfalls bestimmt.

Die Steroidumwandlungen erfolgten üblicherweise mit 100 mg der *C. simplex*-Immobilisate in 50 ml Substratlösung bei 30°C und 160 U/min unter nicht-sterilen Reaktionsbedingungen.

Die Abhängigkeiten der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der *C. simplex*-Immobilisate und der freien *C. simplex*-Zellen von der Substratkonzentration sind in den Abb. 13 - 16 (S. 97 - 100), von der Menadion-Konzentration in der Abb. 18 (S. 105) und von der DMF-Konzentration in der Abb. 22 (S. 115) dargestellt.

Das Temperaturoptimum der Aktivität für die freien und immobilisierten *C. simplex*-Zellen lag bei 30°C. Bei 50°C zeigten die freien wie die immobilisierten *C. simplex*-Zellen keine enzymatische Aktivität mehr (Abb. 19, S. 108). Das pH-Optimum der Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität lag, wie es für *C. simplex*-Zellen zu erwarten war, um den Neutralpunkt (Abb. 21, S. 110).

Der Einfluß organischer Lösungsmittel auf die Aktivität der Immobilisate ist in Abb. 22 (S. 115), Tab. 14 (S. 116) und in Abb. 23 (S. 118) dargestellt. Steroidumsetzungen in

organischen Lösungsmitteln ohne Zusatz von wäßrigen Pufferlösungen führten zur vollständigen Inaktivierung der Immobilisate.

Die höchsten enzymatischen Aktivitäten zeigten die C. simplex-Immobilisate in Substratlösungen aus 2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 0,5 mmol l⁻¹ Menadion und 1 % DMF in Phosphat-Puffer (pH 6,8). In Substratlösungen der angegebenen Zusammensetzung zeigten die C. simplex-Immobilisate die in Tab. 23 angegebenen biokatalytischen Aktivitäten.

Die immobilisierten C. simplex-Zellen zeigten nach der Inkubation gegenüber den freien, nicht inkubierten Zellen ein unterschiedliches kinetisches Verhalten. Die scheinbaren Michaelis-Menten-Konstanten und die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten, die aus der Abhängigkeit der Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität von der Substratkonzentration ermittelt wurden, ergaben bei den Immobilisaten auf der Basis von PVA im Vergleich zu den freien Zellen höhere Werte (Abb. 17, S. 102 und Tab. 13, S. 103). Als Grund hierfür kann die eingeschränkte Diffusion des Substrates in der polymeren Matrix sowie die nach der Inkubation höhere Enzymkonzentration in den immobilisierten C. simplex-Zellen angesehen werden.

Nur eine vergleichsweise geringe Steroid- Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität besaßen die in die Polymerisate I-B/3 und I-B/4 eingeschlossenen C. simplex-Zellen. Die hier zur Vernetzung zugesetzten niedermolekularen Reagenzien führten offensichtlich zu einer teilweisen Schädigung der Zellen. Auch die in dem mit UV-Licht photovernetztem Polymerisat I-B/2 immobilisierten C. simplex-Zellen zeigten bei längerer Bestrahlungsdauer eine Verringerung der enzymatischen Aktivität (Tab. 20, S. 153).

Tab. 23: Biokatalytische Aktivitäten der *C. simplex*-Immobilisate bei der Steroidtransformation von Hydrocortison zu Prednisolon in optimierten Substratlösungen
(Substratlösung: 2,0 mmol l⁻¹ Hydrocortison, 0,5 mmol l⁻¹ Menadiol, 1 % DMF in Phosphat-Puffer)

Immobilisat-Nr.:	Aktivität		Aktivitätsausbeute
	($\mu\text{mol/g}_{\text{Imm. h}}$)	($\mu\text{mol/g}_{\text{Bakt. h}}$)	(%)
freies <i>C. simplex</i>	-	87 - 126,4	-
I-A2/1- a) <i>C. simplex</i>	200	400	316
I-B1/1- b) <i>C. simplex</i>	169	213,9	246
IIb- c) <i>C. simplex</i>	88,3	327	297
II-co2b- c) <i>C. simplex</i>	117,8	251,8	238
II-co3b- c) <i>C. simplex</i>	94,9	197,7	180

- a) Aktivitätsbestimmung mit 100 mg Immobilisat in 100 ml Substratlösung nach 24 stündiger Inkubation in 0,2 mmol l⁻¹ Hydrocortison
- b) Aktivitätsbestimmung mit 100 mg Immobilisat in 50 ml Substratlösung nach 24 stündiger Inkubation in 0,5 mmol l⁻¹ Hydrocortison
- c) wie in b) angegeben, jedoch Inkubation in 1,0 mM Hydrocortison.

Aus einer 2,0 mM Hydrocortison-Lösung der oben beschriebenen Zusammensetzung wurden unter den optimierten Reaktionsbedingungen von 100 mg der C. simplex-Immobilisate bei vollständigem Hydrocortison-Abbau maximal 90 - 95 % Prednisolon erhalten. Die unvollständige Umwandlung des Hydrocortisons zu Prednisolon läßt sich durch einen Abbau der Steroide im allgemeinen Stoffwechsel der Zellen erklären.

Die enzymatische Aktivität der immobilisierten C. simplex-Zellen wurde über einen längeren Zeitraum mehrfach bestimmt, um die Operationsstabilität der Immobilisatprodukte und ihre Lagerstabilität zu verfolgen.

Die Halbwertszeit der C. simplex-Immobilisate, die Zeit in der die Zellen noch 50 % ihrer ursprünglichen Aktivität zeigen, wurde als Kriterium für die enzymatische Stabilität der Biokatalysatoren bei aufeinanderfolgenden Steroidumsetzungen in Substratlösungen verschiedener Zusammensetzung bestimmt. Es zeigte sich, daß die enzymatische Stabilität der immobilisierten C. simplex-Zellen in Substratlösungen, die einen Cofaktor wie Menadion oder N-Methylphenazonium-metnosulfat enthielten, gering war. Die Halbwertszeit betrug hier 2 - 3 Tage (Abb. 24, S. 121). Die Halbwertszeit der immobilisierten Zellen konnte auf 14 Tage erhöht werden, wenn der Substratlösung kein Cofaktor zugesetzt wurde (Abb. 25, S. 124). In cofaktor-freien Substratlösungen zeigten die Immobilisate jedoch eine geringere Aktivität. In Substratlösungen, die Hydrocortison in fester, mikronisierter Form ohne Cofaktor und ohne organische Lösungsmittel enthielten (pseudokristalline Fermentation), zeigten die immobilisierten C. simplex-Zellen hingegen eine bemerkenswerte enzymatische Stabilität (Abb. 26 - 28, S. 126 - 128). Alle untersuchten C. simplex-Immobilisate zeigten bei den aufeinanderfolgenden Steroidumsetzungen in Substratlösungen mit festem Hydrocortison eine zunehmende enzymatische Aktivität. Während der mit ein und derselben Immobilisatprobe (100 mg I-B1/1-C. simplex-Immobilisat) durchgeführten je

24 stündigen 27 Steroidumsetzungen (36,2 mg Hydrocortison/ 50 ml Phosphat-Puffer) innerhalb von 7 Wochen erhöhte sich der Umsatz zu Prednisolon von anfänglich 57,7 % auf 93,2 % beim 27. Umsatz. Die Aktivität der immobilisierten *C. simplex*-Zellen zu Beginn der Untersuchung betrug hier 36,3 $\mu\text{mol/g}_{\text{Imm.}} \cdot \text{h}$ und erhöhte sich nach dem 25. Umsatz auf 117,7 $\mu\text{mol/g}_{\text{Imm.}} \cdot \text{h}$. Die Ursache der Aktivitätszunahme während dieser Untersuchung liegt wahrscheinlich in einer weiteren Enzyminduktion begründet, die durch die Abwesenheit zellschädigender Substanzen ermöglicht wurde. Da die Aktivität der *C. simplex*-Immobilisate in Substratlösungen mit festem Hydrocortison sich nicht verringerte, muß hier auf die Angabe einer Halbwertszeit verzichtet werden.

Die maximal mögliche Beladung eines Bioreaktors mit festem Hydrocortison wurde bei entsprechend verlängerter Reaktionszeit mit 100 mg *C. simplex*-Immobilisat in Substratlösungen bestimmt, die bis zu 600 mg mikronisiertes Hydrocortison/ 50 ml Phosphat-Puffer (33,1 mmol l^{-1}) enthielten. Erst bei Hydrocortison-Konzentrationen über 362 mg/50 ml (20 mmol l^{-1}) erfolgte ein geringerer Umsatz zu Prednisolon (Tab. 16, S. 131). Als Ursache kann hier am ehesten eine Diffusionshemmung in der polymeren Matrix durch Kristallisation von Substrat und Produkt auf der Katalysatoroberfläche und damit das Verstopfen der Poren des Biokatalysators vermutet werden.

Bei den Steroidumsetzungen, die in Substratlösungen ohne Cofaktor durchgeführt wurden, wurde vereinzelt ein vollständiger Abbau von bereits gebildetem Prednisolon beobachtet (Abb. 29, 30; S. 133, 134). Der Prednisolon-Abbau durch die immobilisierten *C. simplex*-Zellen verringerte sich - vermutlich aufgrund der durch die Enzymbiosynthese zunehmenden Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Konzentration in den Zellen - im Laufe mehrerer Steroidumsetzungen.

Untersuchungen zur Vermehrungsfähigkeit der Zellen in den polymeren Netzwerken ergaben, daß die immobilisierten Zellen ihre Wachstumsfähigkeit behalten hatten.

Ein Wachstum der Zellen in den Polymerisaten wurde jedoch nur beobachtet, wenn die Immobilisate in einer Nährlösung (0,5 % Corn steep, 0,1 % Hefeextrakt und 0,05 % Stärkezucker oder in 0,2 - 0,5 % Pepton in Phosphat-Puffer) inkubiert wurden und die Immobilisate anfänglich nur eine geringe Zellkonzentration enthielten (Tab. 17, S. 142).

Bei den Steroidumsetzungen, die in nährmedien-freien Substratlösungen durchgeführt wurden, konnte ein Wachstum der eingeschlossenen Zellen nicht festgestellt werden (Tab. 15, S. 130).

In Gegenwart von Nährmedien konnten die immobilisierten *C. simplex*-Zellen unter Erhöhung ihrer biokatalytischen Stabilität reaktiviert werden (Abb. 32-34, S. 145 - 149).

Ihre enzymatische Aktivität behielten die *C. simplex*-Immobilisate auch, wenn sie zwischen einzelnen Steroidumsetzungen gelagert wurden. Selbst nach mehr als 6 monatiger Lagerung als Lyophilisat oder unter Phosphat-Puffer zeigten die Immobilisatproben noch ihre vollständige katalytische Aktivität (Tab. 19, S. 151). Während der Steroidumsetzungen erhöhte sich der Umsatz zu Prednisolon sogar noch, wenn die Umsetzungen mit mikronisiertem Hydrocortison in der pseudokristallinen Fermentationstechnik in Abwesenheit eines Cofaktors und organischer Lösungsmittel durchgeführt wurden.

Die *Bacillus sphaericus*-Immobilisate zeigten mit $13 \mu\text{mol/g}_{\text{Imm}} \cdot \text{h}$ eine vergleichsweise geringe Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität. Bei den mit den *Bacillus sphaericus*-Immobilisaten durchgeführten Steroidumsetzungen wurde entgegen den Erwartungen ebenfalls ein Abbau des Steroidproduktes beobachtet.

Mit den immobilisierten *Pseudomonas putida*- und *Candida parapsilosis*-Zellen wurden Untersuchungen über den mikrobiellen Abbau von Alkanen durchgeführt. Diese Untersuchungen führte Prof. Dr. H. J. Rehm am Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität durch. Eine Auswertung der Ergebnisse war aufgrund auftretender Infektionen bei den Immobilisierungsprodukten nicht möglich.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß in Polymerisate auf der Basis von Poly-(vinylalkohol) und Poly-(acrylsäure) durch Einschlußreaktion immobilisierte Mikroorganismen erfolgreich zu Biotransformationsreaktionen verwendet werden können.

Die Steroid- Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität von immobilisierten *Corynebakterium simplex*-Zellen konnte durch Enzyminduktion um das 2 - 3 fache gegenüber der Aktivität der freien Zellen, die zur Immobilisierung verwendet wurden, gesteigert werden. Die Immobilisierungsprodukte, die in Folien- und Partikelform erhalten wurden, zeigen eine beachtenswerte Operations- und Lagerstabilität. Ihre chemische und mechanische Stabilität ermöglicht eine Anwendung in verschiedenen Einsatzbereichen. Die in der pseudokristallinen Fermentationstechnik durchgeführten Steroidumsetzungen mit festem Substrat führten zu einem kristallinen Reaktionsprodukt. Hieraus ergeben sich interessante technische Anwendungsmöglichkeiten.

6. Literaturverzeichnis

- 1) G. Neesemann, W. Dimmling
Chemiker-Zeitung 11 (1974) 523
- 2) K. Kieslich
Synthesis 1969 120
- 3) G. Manecke
Chimia 28 (1974) 467
- 4) H. H. Weetall
Immobilized Enzymes 1, Marcel Dekker, Inc.,
New York (1975)
- 5) G. Manecke, W. Stork
Angew. Chem. 90 (1978) 691
- 6) M. Marconi
Industrial Aspects of Biochemistry, (Hrsg.
B. Spencer) (1974), S. 139
- 7) K. Murata, K. Tani, J. Kato, I. Chibata
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6 (1978) 23
- 8) K. Yamamoto, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata
Biotechnol. Bioeng. 16 (1974) 1589
- 9) M. Nelboek, D. Jaworek
Chimia 29 (1975) 109
- 10) J. Klein, F. Wagner
Dechema Monographie 82, Verlag Chemie, Weinheim/-
Bergstr. (1978), S. 142
- 11) T. Hattori, C. Furusaka
J. Biochem. (Tokyo) 48 (1960) 831 und
50 (1961) 312
- 12) K. Mosbach, R. Mosbach
Acta. Chem. Scand. 20 (1966) 2807
- 13) P. Brodelius, B. Deus, K. Mosbach, M. H. Zenk
Enzyme Eng. Vol. 5 (Hrsg. H. H. Weetall,
G. P. Royer) Plenum Press, New York 1980, S. 373

- 14) M. Kierstan, C. Bucke
Biotechnol. Bioeng. 19 (1977) 387
- 15) K. Yamamoto, T. Tosa, K. Yamashita, I. Chibata
Eur. J. Appl. Microbiol. 3 (1976) 169
- 16) H. Lang
Kontakte (Merck) 3 (1980) 22
- 17) T. R. Jack, J. E. Zajic
Adv. Biochem. Eng. 5 (1977) 126
- 18) B. J. Abbott
Adv. Appl. Microbiol. 20 (1976) 203
- 19) G. Durand, J. M. Navarro
Proc. Biochem. 1978 14
- 20) B. P. Sharma, L. F. Bailey, R. A. Messing
Angew. Chem. 94 (1982) 836
- 21) P. S. J. Cheetham
Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology,
Vol. 4, (Hrsg. A. Wisemann), J. Wiley & Sons,
New York 1980
- 22) B. J. Abbott
Annual Rep. on Ferment. Proc., Vol. 1,
(Hrsg. D. Perlman, C. T. Tsao) Academic Press,
New York 1977, S. 205
- 23) J. Chibata, T. Tosa
Adv. Appl. Microbiol. 22 (1977) 1
- 24) W. Beier
Diplomarbeit, Freie Universität, Berlin 1979
- 25) G. Manecke, W. Beier
Angew. Makromol. Chem. 104 (1982) 39
- 26) G. Manecke, W. Beier
Angew. Makromol. Chem. 113 (1983) 179
- 27) J. Klein, G. Manecke
Enzyme Engineering, Vol. 6, (Hrsg. J. Chibata,
S. Fukui, L. B. Wingard) Plenum Press,
New York 1982, S. 181

- 28) W. Funke
Chimia 22 (1968) 111
- 29) K. Hummel
Angew. Makromol. Chem. 75/77 (1979) 25
- 30) K. A. Koshcheenko, L. A. Krasnova, L. K. Garcia-Rodrigues,
V. J. Surovtsev, G. K. Skrabin
Appl. Biochem. Microbiol. 12 (1976) 259
- 31) R. Scherrer, L. Louden, P. Gerhardt
J. Bacteriol. 118 (1974) 534
- 32) H. Nikaido
Angew. Chem. 91 (1979) 394
- 33) H. G. Vogt,
Dissertation, Freie Universität Berlin (1979)
- 34) V. Böhmer
Chemiker Zeitung 4 (1974) 169
- 35) G. G. Cameron, J. Cameron
Polymer 14 (1973) 107
- 36) L. F. Fieser, M. Fieser
Steroids, Reinhold Publ. Corp., New York 1959
- 37) G. Raspe, K. Kieslich, E. Olivar, R. Müller, B. Wagner
Ger. 1, 135, 899 (1962), Schering AG,
C.A. 58: 14 664 (1963)
- 38) T. H. Stoudt, W. J. McAleer, J. M. Chernerda,
M. A. Kozlowski, R. F. Hirschmann, V. Marlatt, R. Millar
Arch. Biochem. Biophys. 59 (1955) 304
- 39) L. Penasse, M. Peyre
Steroids 12 (1968) 525
- 40) H. L. Herzog, C. C. Payne, M. Tully Hughes, M. Jevnik Gentles
E. B. Hershberg, A. Nobile, W. Charney, C. Federbush,
D. Sutter, P. L. Perlman
Tetrahedron 18 (1962) 581

- 41) A. Nobile, W. Charney, P. L. Perlman, H. L. Herzog,
C. C. Payne, M. E. Tully, M. A. Jernick, E. B. Hersberg
J. Am. Chem. Soc. 77 (1955) 4184
- 42) W. Siegenthaler, C. Wernig, W. Vetter
Klinische Pathophysiologie, (Hrsg. W. Siegenthaler)
4. Aufl. Thieme-Verlag, Stuttgart 1979, S. 360
- 43) A. Kleemann
Pharmazeutische Wirkstoffe: Synthesen, Patente,
Anwendungen, Thieme-Verlag, Stuttgart 1978
- 44) W. Charney, H. L. Herzog
Microbiol. Transformation of Steroids,
Academic Press, New York 1967, S. 356
- 45) H. R. Levy, P. Talalay
J. Am. Chem. Soc. 79 (1957) 2658
- 46) C. J. Sih, R. E. Benett
Biochim. Biophys. Acta. 38 (1960) 378
- 47) R. Jerussi, H. J. Ringold
Biochemistry 4 (1965) 2113
- 48) R. A. Alberty
J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 1928
- 49) P. O. Larsson, S. Ohlson, K. Mosbach
Nature 263 (1976) 796
- 50) S. Ohlson, P. O. Larsson, K. Mosbach
Biotechnol. Bioeng. 20 (1978) 1267
- 51) S. Ohlson, P. O. Larsson, K. Mosbach
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7 (1979) 103
- 52) K. Venkatasubramanian, A. Constandinides, W. R. Vieth
Enzyme Engineering, Vol. 3. (Hrsg. E. K. Pye,
H. H. Weetall), Plenum Press, New York 1978, S. 29
- 53) A. Constantinides
Biotechnol. Bioeng. 22 (1980) 119
- 54) T. Omata, A. Tanaka, T. Yamane, S. Fukui
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6 (1979) 207

- 55) K. Sonomoto, A. Tanaka, T. Omata, T. Yamane, S. Fukui
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6 (1979) 325
- 56) G. Manecke, U. Klussmann
Makromol. Chem., Rapid Commun. 4 (1983) 411
- 57) H. J. Somerville, R. N. Ruffell
Eur. J. Appl. Microbiol. 4 (1977) 75
- 58) J. R. Mason, S. J. Pirt, H. J. Somerville
Enzyme Engineering, Vol. 4 (Hrsg. G. B. Broun,
G. Manecke, L. B. Wingard, Jr.)
Plenum Press, New York 1978, S. 343
- 59) J. Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori, K. Yamamoto
Enzyme Engineering, Vol 2 (Hrsg. E. K. Pye,
L. B. Wingard, Jr.) Plenum Press, New York 1974,
S. 303
- 60) C. A. Finch
Polyvinylalcohol-Properties and Applications,
J. Wiley & Sons, London 1973
- 61) J. G. Pritchard
Polymer Monographs (Hrsg. H. Morawetz)
Gordon and Breach Science Publ., London 1970
- 62) C. W. Mortenson
U.S. 2,443,923 (1948), E. J. Du Pont de Nemours
& Co., C.A. 42 (1948) 7108e
- 63) P. W. Riddles, R. L. Blakeley, B. Zenner
Anal. Biochem. 94 (1979) 75
- 64) J. L. R. Williams
Fortschr. chem. Forsch. 13/2 (1969) 227
- 65) S. Fukui, S. A. Ahmed, T. Omata, A. Tanaka
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 10 (1980) 289
- 66) H. Tanaka, C. Azuma, K. Sanui, N. Ogata
Kobunshi Robunshu-38 (1981)-529, C.A. 95: 170 020
- 67) T. Tsunoda, T. Yamaoka
J. Appl. Polym. Sci. 8 (1964) 1379.

- 68) K. Takakura, G. Takayama, J. Ukida
J. Appl. Polym. Sci. 9 (1965) 3217
- 69) E. M. Robertsen, W. P. VanDeusen, L. M. Minsk
J. Appl. Polym. Sci. 2 (1959) 308
- 70) M. Tsuda
J. Polym. Sci. 5 (1963) 215
- 71) L. M. Minsk, J. G. Smith, W. P. VanDeusen, J. F. Wright
J. Appl. Polym. Sci. 2/6 (1959) 302
- 72) Y. Kurusu, H. Nishiyama, M. Okawara
Makromol. Chem. 138 (1970) 49
- 73) H. Roth et. al. in Methoden der Organischen Chemie
(Houben-Weyl-Müller), 4. Aufl., Bd. II,
Thieme-Verlag, Stuttgart 1953, S. 33
- 74) G. Oster
Nature 173 (1954) 300
- 75) G. K. Oster, G. Oster, G. Prati
Nature 79 (1957) 595
- 76) G. Delzenne, W. Dewinter, S. Toppet, G. Smets
J. Polym. Sci. 2 (1964) 1069
- 77) H. Vogel
Chemie und Technik der Vitamine, 3. Aufl.,
Bd. 2, F. Enke-Verlag, Stuttgart 1953
- 78) M. O. L. Crowe
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 42 (1939) 212
- 79) A. J. Woitod, F. V. Linggood
Nature 162 (1948) 219
- 80) Y. Morikawa, K. Ochiai, J. Karube, S. Suzuki
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 15 (1979) 126
- 81) W. Kuhn, G. Balmer
J. Polym. Sci. 57 (1962) 311
- 82) W. Hagg
Ger. 1 266 503 (1968)

- 83) T. Omata, T. Iida, A. Tanaka, S. Fukui
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8 (1979) 143
- 84) M. Tsuda
Makromol. Chem. 72 (1964) 174
- 85) H. Beyer
Lehrbuch der Organischen Chemie, 17. Aufl.
S. Hirzel-Verlag, Stuttgart 1973, S. 330
- 86) F. Kollinsky in Methoden der Organischen Chemie
(Houben-Weyl-Müller), 4. Aufl., Bd. 14/1,
Thieme-Verlag, Stuttgart 1977, S. 1052
- 87) H. G. Elias
Makromoleküle, 3. Aufl., Hüthig & Wepf-Verlag,
Basel (1975)
- 88) F. Runge, E. Taeger
Einführung in die Chemie und Technologie der
Kunststoffe, 4. Aufl., Akademie-Verlag,
Berlin 1976
- 89) L. Y. Young
J. Polym. Sci. 54 (1961) 411
- 90) C. C. Price
J. Polym. Sci. 3 (1948) 772
- 91) K. Hayashi, G. Smets
J. Polym. Sci. 27 (1958) 275
- 92) J. F. Bork, L. E. Colemann
J. Polym. Sci. 43 (1960) 413
- 93) W. Kern, Th. Hucke, R. Holländer, R. Schneider
Makromol. Chem. 22 (1957) 31
- 94) R. v. Rothenburg
J. prakt. Chem. 51 (1895) 72
- 95) Th. Curtius
J. prakt. Chem. 50 (1874) 275
- 96) F. Jacob, J. Monod
J. Molecul. Biol. 3 (1961) 318

- 97) E. Buddecke
Grundriß der Biochemie, 5. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin 1977, S. 115
- 98) E. N. Udvardy
Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung. 21 (1974) 237
- 99) J. Klein
Kontakte (Merck) 3 (1980) 29
- 100) C. N. Satterfield
Mass Transfer in Heterogeneous Catalysis, Cambridge, Mass. 1970
- 101) W. R. Vieth, K. Venkatasubramanian, A. Constantinides, S. Davidson
Appl. Biochem. Bioeng. 1 (1976) 221
- 102) S. Konoshita, M. Muranaka, H. Okada
J. Ferment. Technol. 53 (1975) 223
- 103) J. Klein, F. Wagner
Enzyme Engineering, Vol. 5. (Hrsg. H. H. Weetall, G. P. Royer), Plenum Press, New York 1980, S. 335
- 104) G. A. Truesdale, A. L. Downing, G. F. Lowden
J. Appl. Chem. 5 (1955) 53
- 105) E. N. Udvardy, G. Hantos, Zs. Szentirmay
3. Symposium Technische Mikrobiologie, Berlin 1973, S. 431
- 106) H. Lineweaver, D. Burk
J. Amer. Chem. Soc. 56 (1934) 658
- 107) A. Bretz
Enzyme: Gewinnung-Analyse-Regulation
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1974, S. 111
- 108) J. M. C. Duarte, M. D. Lilly
Enzyme Engineering, Vol. 5, (Hrsg. H. H. Weetall, G. P. Royer) Plenum Press, New York 1980, S. 363
- 109) E. Antonini, G. Carrea, P. Cremonesi
Enz. Microb. Technol. 3 (1981) 291 und dort zitierte Literatur

- 110) T. Omata, N. Iwamoto, T. Kimura, A. Tanaka, S. Fukui
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11
(1981) 199
- 111) P. Cremonesi, G. Mazzola, L. Cremonesi
Annali die Chimica 67 (1977) 415
- 112) P. O. Larsson, S. Ohlson, K. Mosbach
Enzyme Engineering, Vol. 4, (Hrsg. G. B. Broun,
G. Manecke, L. B. Wingard, Jr.) Plenum Press,
New York 1978, S. 317
- 113) F. Lavelle, A. M. Michelson, L. Dimitrijevic
Biochem. Biophys. Res. Comm. 55 (1973) 350
- 114) F. Kondo, E. Masuo
J. Gen. Appl. Microbiol. 7 (1961) 113
- 115) C. J. Sih
Biochim. Biophys. Acta. 62 (1962) 541
- 116) E. Jawetz, J. L. Melnick, E. A. Adelberg
Medizinische Mikrobiologie (Übers.: G. Maass,
R. Thomssen), 5. Aufl., Springer, Berlin 1980
- 117) M. Kumakura, M. Yoshida, J. Kaetsu
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6 (1978) 13

Lebenslauf

Name: Wilfried Beier
Geburt: 22. Februar 1949 in Genthin/DDR
Familie: Ehefrau Ursula (card. med.)
Tochter Maren
Eltern: Franz und Anna Beier

Schulbildung und Lehre:

1955 - 1964 Volksschule in Genthin, Kirchmöser/Brandenburg (DDR) und Saarlouis/Saarland
1964 - 1966 Lehre als Postjungbote beim Postamt Saarlouis
- Lehrabschlußprüfung bei der Oberpostdirektion in Saarbrücken
1964 - 1966 Besuch der Kaufmännischen Berufsschule in Saarbrücken
1966 - 1969 Besuch der Staatlich anerkannten Berufsaufbauschule
- Kaufm. Zweig - des Berufsförderungswerkes des Saarlandes in Dillingen/Saar
Abschluß: Kaufmännische Fachschulreife
1969 - 1972 Besuch des Staatlichen Speyer-Kollegs
- Institut zur Erlangung der Hochschulreife in Speyer/Rhein
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

SS 1972 - Chemie-Studium an der Freien Universität Berlin
WS 1978/79 Nebenfach: Biochemie
Vordiplom-Prüfung: 22. Okt. 1974
Diplom-Prüfung: 11. Jan. 1979
Diplom-Arbeit:
unter der Anleitung von Prof. Dr. G. Manecke
am Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft in Berlin-Dahlem
Thema: "Über einige reaktionsfähige chinongruppenhaltige Hochpolymere als Träger zur Immobilisierung von Enzymen"

1966 - 1969 Anstellung als beamteter Postschaffner bei
der Deutschen Bundespost

1978 - 1979 Studentischer Tutor am Institut für Organische
Chemie der FU Berlin

seit 1979 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut
für Organische Chemie der FU Berlin.

